

**Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
an der Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn**

**Vergleichende Untersuchung zur Sensibilität von
Knochenmark und Spermatogonien des chinesischen
Hamsters gegenüber Cyclophosphamid**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

Leo Victor

1978

1979

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie

an der Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn

Vergleichende Untersuchung zur Sensibilität von
Knochenmark und Spermatogonien des chinesischen
Hamsters gegenüber Cyclophosphamid

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Leo Victor

1978



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Reinauer

Referent

gez.: Prof. Dr. Röhrborn

Korreferent

gez.: Prof. Dr. Schübel

Meinen Eltern in Dankbarkeit

1. Einleitung	1
2. Die Eltern	2
3. Die Eltern in der Kindheit	3
4. Die Eltern in der Jugend	4
5. Die Eltern in der Ehe	5
6. Die Eltern in der Familie	6
7. Die Eltern in der Gesellschaft	7
8. Die Eltern in der Politik	8
9. Die Eltern in der Kunst	9
10. Die Eltern in der Wissenschaft	10
11. Die Eltern in der Religion	11
12. Die Eltern in der Philosophie	12
13. Die Eltern in der Ethik	13
14. Die Eltern in der Psychologie	14
15. Die Eltern in der Pädagogik	15
16. Die Eltern in der Medizin	16
17. Die Eltern in der Naturwissenschaft	17
18. Die Eltern in der Technik	18
19. Die Eltern in der Wirtschaft	19
20. Die Eltern in der Soziologie	20
21. Die Eltern in der Anthropologie	21
22. Die Eltern in der Biologie	22
23. Die Eltern in der Geologie	23
24. Die Eltern in der Astronomie	24
25. Die Eltern in der Kosmologie	25
26. Die Eltern in der Meteorologie	26
27. Die Eltern in der Klimatologie	27
28. Die Eltern in der Hydrologie	28
29. Die Eltern in der Ozeanographie	29
30. Die Eltern in der Geographie	30
31. Die Eltern in der Historie	31
32. Die Eltern in der Archäologie	32
33. Die Eltern in der Ethnologie	33
34. Die Eltern in der Linguistik	34
35. Die Eltern in der Literaturwissenschaft	35
36. Die Eltern in der Kunstgeschichte	36
37. Die Eltern in der Musikwissenschaft	37
38. Die Eltern in der Theaterwissenschaft	38
39. Die Eltern in der Filmwissenschaft	39
40. Die Eltern in der Medienwissenschaft	40
41. Die Eltern in der Kommunikationswissenschaft	41
42. Die Eltern in der Informationswissenschaft	42
43. Die Eltern in der Rechtswissenschaft	43
44. Die Eltern in der Politikwissenschaft	44
45. Die Eltern in der Soziologie	45
46. Die Eltern in der Anthropologie	46
47. Die Eltern in der Biologie	47
48. Die Eltern in der Geologie	48
49. Die Eltern in der Astronomie	49
50. Die Eltern in der Kosmologie	50
51. Die Eltern in der Meteorologie	51
52. Die Eltern in der Klimatologie	52
53. Die Eltern in der Hydrologie	53
54. Die Eltern in der Ozeanographie	54
55. Die Eltern in der Geographie	55
56. Die Eltern in der Historie	56
57. Die Eltern in der Archäologie	57
58. Die Eltern in der Ethnologie	58
59. Die Eltern in der Linguistik	59
60. Die Eltern in der Literaturwissenschaft	60
61. Die Eltern in der Kunstgeschichte	61
62. Die Eltern in der Musikwissenschaft	62
63. Die Eltern in der Theaterwissenschaft	63
64. Die Eltern in der Filmwissenschaft	64
65. Die Eltern in der Medienwissenschaft	65
66. Die Eltern in der Kommunikationswissenschaft	66
67. Die Eltern in der Informationswissenschaft	67
68. Die Eltern in der Rechtswissenschaft	68
69. Die Eltern in der Politikwissenschaft	69
70. Die Eltern in der Soziologie	70
71. Die Eltern in der Anthropologie	71
72. Die Eltern in der Biologie	72
73. Die Eltern in der Geologie	73
74. Die Eltern in der Astronomie	74
75. Die Eltern in der Kosmologie	75
76. Die Eltern in der Meteorologie	76
77. Die Eltern in der Klimatologie	77
78. Die Eltern in der Hydrologie	78
79. Die Eltern in der Ozeanographie	79
80. Die Eltern in der Geographie	80
81. Die Eltern in der Historie	81
82. Die Eltern in der Archäologie	82
83. Die Eltern in der Ethnologie	83
84. Die Eltern in der Linguistik	84
85. Die Eltern in der Literaturwissenschaft	85
86. Die Eltern in der Kunstgeschichte	86
87. Die Eltern in der Musikwissenschaft	87
88. Die Eltern in der Theaterwissenschaft	88
89. Die Eltern in der Filmwissenschaft	89
90. Die Eltern in der Medienwissenschaft	90
91. Die Eltern in der Kommunikationswissenschaft	91
92. Die Eltern in der Informationswissenschaft	92
93. Die Eltern in der Rechtswissenschaft	93
94. Die Eltern in der Politikwissenschaft	94
95. Die Eltern in der Soziologie	95
96. Die Eltern in der Anthropologie	96
97. Die Eltern in der Biologie	97
98. Die Eltern in der Geologie	98
99. Die Eltern in der Astronomie	99
100. Die Eltern in der Kosmologie	100

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A Einleitung	1
I Problemstellung	1
II Chemische Struktur und Pharmakologie der Testsubstanz Cyclophosphamid	7
III Reaktionsmechanismen alkylierender Substanzen	13
IV Toxikologie von Cyclophosphamid	21
B Material und Methoden	24
I Chromosomendarstellung durch Präparation von Knochenmark	26
1. Allgemeines	26
2. Technik der Präparation	31
3. Auswertung	33
II Chromosomendarstellung durch Präparation der Hodentubuli	36
1. Allgemeines	36
2. Technik der Präparation	40
3. Auswertung	42
III Der Mikrokerntest	44
1. Allgemeines	44
2. Technik der Präparation	45
3. Auswertung	47

	Seite
C Ergebnisse und Auswertung	49
I Chromosomenanalyse im Knochenmark	49
II Chromosomenanalyse der Spermatogonien	57
III Mikrokerntest	59
D Diskussion	64
E Zusammenfassung	84
F Literaturverzeichnis	86

A Einleitung

I Problemstellung

Die Belastung unserer Umwelt mit vom Menschen produzierten Schadstoffen hat sich in den letzten Jahrzehnten sprunghaft gesteigert. Oft handelt es sich um Stoffe, deren Schädlichkeit erst spät oder zumindest sehr zögernd bekannt wurde, da sie primär für die Menschheit von Nutzen waren und sind. Beispiele sind Pestizide, Kunststoffe, Konservierungsmittel und Arzneimittel. Häufiger handelt es sich um noch nicht bekannte und nicht einkalkulierbare Abfallstoffe und Nebenprodukte, die unsere Ökosysteme beeinträchtigen. Die toxischen Wirkungen der verschiedenen Stoffe wurden schon relativ früh erkannt und untersucht. Nicht zuletzt war dies die Folge der klinischen Erscheinungsbilder, die sich bei Mensch und Tier einstellten. Die Silikose, Anthrasilikose und Schwermetallvergiftungen sind Beispiele hierfür.

Später erst erkannte man die Schädigung des genetischen Materials durch Fremdstoffe. 1943 machte Auerbach auf eine mögliche Schädigung der Erbsubstanz durch chemische Verbindungen aufmerksam. Ebenfalls 1943 entdeckte Oehlkers die mutagene Wirkung von

Äthylurethan an Pflanzenchromosomen, und Rappoport konnte 1946 die mutagene Wirkung des Formaldehyds nachweisen. Diese Untersuchungen zählen zu den Pionierarbeiten in diesem Forschungsbereich (Rieger und Michaelis 1967). Sie zeigen, daß sich die im Normalfall niedrige spontane Aberrationsrate erhöhen läßt, wenn bestimmte chemische, als Mutagene bezeichnete Stoffe auf Zellpopulationen zur Einwirkung kommen.

Wenn Mutationen zweifellos für die Evolution Voraussetzung waren, so ist doch eine unkontrollierte Steigerung der Mutationsrate durch Agenzien und Strahlen für einen hochentwickelten Organismus schädlich.

• So können Chromosomenmutationen und Genommutationen an Keimzellen beim Menschen zu Spontanaborten, komplexen Mißbildungssyndromen, und Genmutationen zu Mißbildungen und Stoffwechselstörungen führen. Durch Chromosomenmosaik können beim Embryo Mißbildungen auftreten (Rohrborn 1974).

Aufgabe der Mutagenitätsforschung ist es also, möglichst alle Fremdstoffe auf ihre Mutagenität zu untersuchen, und die hierzu notwendigen Verfahren zu entwickeln und zu beurteilen.

Wir kennen heute im wesentlichen Untersuchungen an Blütenpflanzen, Mikroorganismen, *Drosophila melanoga-*

ster und Säugetieren.

Mikroorganismen, Bakterien dienen im überwiegenden Maße dazu, Punktmutationen nachzuweisen (Iyer und Szybalski 1958).

Nun ist den Genetikern aber schon lange bekannt, daß niedrigere Organismen nicht über die im Säuger ablaufenden Aktivierungsmechanismen verfügen, und so sind Ergebnisse, die an Bakterien und Blütenpflanzen gewonnen werden, nicht auf den Menschen übertragbar.

Ein Kombinationsverfahren zur Aufdeckung von Punktmutationen bietet der sog. Host-mediated Essay. Hierbei werden dem Säuger die Keime injiziert und die Wirte anschließend den zu testenden Einflüssen ausgesetzt. Die rückgewonnenen Mikroorganismen werden dann auf Punktmutationen hin untersucht (Cabridge und Legator 1969). Die Metabolisierung erfolgt zwar im Säuger, die Punktmutationen und deren Nachweis jedoch im Einzeller.

Die bedeutendste Rolle als Testobjekt für den Nachweis Aberrationen auslösender Mutagene spielen jedoch Säugetiere. Wir unterscheiden hier Untersuchungen in vivo und in vitro.

Der Vorteil der in vitro Studien ist die Tatsache, daß in diesem Verfahren auch menschliche Zellen, so zum

Beispiel Lymphozyten und Fibroblasten kultiviert werden können. Der Nachteil ist, daß in vitro kultivierte Zellen nicht immer genauso reagieren wie die gleichen Zelltypen unter in vivo Bedingungen, außerdem können während der Kultur verschiedene abnorme karyologische Veränderungen eintreten (Hsu 1961).

Nur in begrenztem Umfange ist es möglich, beim Menschen in vivo Substanzen auf ihre Mutagenität zu prüfen, so zum Beispiel Nikotin, Coffein als Genußmittel und im besonderen Arzneimittel mit eventuell alkylierendem Charakter nach strenger, meist vitaler Indikation. Die allgemeine Testung von Substanzen am Menschen ist aus ethischen und moralischen Gründen nicht möglich.

Um nun trotzdem der Forderung gerecht zu werden, möglichst alle Umweltchemikalien auf Mutagenität zu untersuchen und das Maß der Extrapolation so gering wie möglich zu halten, ist es notwendig, Säugetiere in vivo mit Testsubstanzen zu behandeln. Es bieten sich hier vor allem kleine Laborsäuger an, wie Maus, Hamster und Ratte, die einfach zu halten sind und eine geringe Generationsdauer haben.

Die Testverfahren selbst sollten eine sichere Auskunft über die Art und den Grad der Schädigung an verschiedenen Geweben geben. Da es nicht einmal möglich

ist, von der Reaktion des einen Gewebes ohne weiteres auf die des anderen zu schließen (Röhrborn 1974), ist es notwendig, die zu testenden Fremdstoffe an vielen Geweben vergleichend zu testen, zumindest aber an somatischen und gonosomalen Zellen. In der vorliegenden Arbeit verglichen wir am chin. Hamster (*Cricetulus griseus*) drei Testmethoden:

1. Die zytogenetische Analyse des Knochenmarkes
2. Die zytogenetische Analyse der Spermatogonien
3. Den Mikrokerntest.

Als Testsubstanz verwendeten wir das als sicheres Mutagen geltende Zytostatikum Cyclophosphamid.

Im Unterschied zur Arbeit von Mohr (1978), der die Dosis-Effekt Beziehung im Knochenmark mit der chromosomalen Analyse und dem Mikrokerntest vergleichend untersuchte, wurde in dieser Arbeit die chromosomale Analyse der Spermatogonien der des Knochenmarkes gegenübergestellt. Es kam uns darauf an, die Reaktion zweier völlig verschiedener Gewebe, nämlich der Keimzellen und des Knochenmarkes, zu ermitteln und zu diskutieren. Auf eine Aufzeichnung der Dosis-Effekt Beziehung wurde hier verzichtet.

Mit den genannten Methoden stellten wir uns die folgenden Aufgaben:

- a. Vergleich der Reaktionen der einzelnen Gewebe auf das Mutagen unter Berücksichtigung qualitativ und quantitativer verfahrenstechnisch bedingter Unterschiede in den einzelnen Methoden.
- b. In den meisten bisher durchgeführten Untersuchungen mit diesen Verfahren werden nur 1 - 2 Applikationen einer relativ hohen Dosis verabreicht. Daher sollte geprüft werden, ob sich ähnliche Aberrationsraten durch eine subakute (5-malige Applikation) im 24-Stunden Intervall zeigen würde.

Zudem ist die subakute Behandlungsweise für die menschliche Therapie relevanter.
- c. Im Vergleich mit den zytogenetischen Testverfahren soll die Brauchbarkeit des Mikrokerntestes als Screening-Test unter den genannten gegen Mohr (1978) veränderten Versuchsbedingungen geprüft werden.
- d) Zusätzlich sollte, da beim Mikrokerntest auf eine Applikation von Colcemide verzichtet werden kann, in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob das Spindelfasergift eine co-mutagene Wirkung in diesem Test besitzt.

Daher wurde im Gegensatz zu den Versuchen von Mohr (1978), der auch zur Herstellung seiner Kontrollwerte in beiden Verfahren, Mikronukleustest und

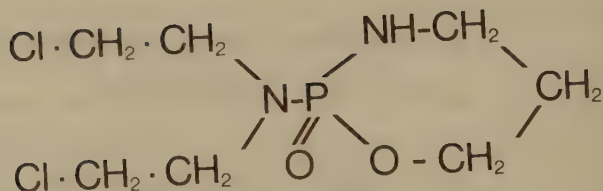
Knochenmarkanalyse, Colcemide verabreichte,
kein Colcemide vor der Aufarbeitung gegeben.

II Chemische Struktur und Pharmakologie der Test- substanz Cyclophosphamid

Zur Klärung dieser Fragen wurde eine Testsubstanz gewählt, deren Pharmakokinetik und Toxikologie relativ gut untersucht ist, und von der bekannt ist, daß sie mutagene Eigenschaften besitzt. Hierbei handelt es sich um Cyclophosphamid mit der chemischen Bezeichnung 2 (Bis- (2-chloräthyl) -amino) - tetrahydro 2 H- 1, 3, 2-oxazaphosphorin- 2-oxid. Diese bifunktionelle N-Loxverbindungs (Abb. 1) wurde 1958 von Arnold und Bourseaux synthetisiert. Das Molekulargewicht beträgt 261,08.

Cyclophosphamid bildet als Hydrat mit einem Mol Wasser weißliche Kristalle aus. Diese Verbindung befindet sich als weit verbreitetes Zytostatikum (Endoxan^R) im Handel.

Abb.: 1 Strukturformel Cyclophosphamid



Sie arbeitet nach dem Prinzip Transportform/Wirkform, das von Druckery und Raabe am Beispiel des Stilbestroldiphosphates zum Zwecke einer größeren therapeutischen Breite eingeführt wurde (Brock 1963). Das bedeutet, daß Cyclophosphamid unter in vitro Bedingungen weitgehend inaktiv und stabil ist und in vivo hochwirksam. Gemessen an der Chlorid-Ionen-Freisetzung ist die Ionisationsgeschwindigkeit in wäßriger Lösung weit geringer als bei allen anderen vergleichbaren N-Lost Präparaten (Brock, Hohorst 1963). Während beim N-Methyl-Lost nach vier Stunden bereits zwei Äquivalente Chloridionen/Mol abgespalten werden, beträgt beim Cyclophosphamid die Cl-Dissoziation noch nach

24-Stunden weniger als 0,05 Äquivalent pro Mol. Ferner reagiert Cyclophosphamid im Gegensatz zu anderen alkylierenden Substanzen nicht unmittelbar mit γ - (4-Nitrobenzyl) -pyridin, sondern erst nach vorheriger Hydrolyse. Es handelt sich hierbei um ein Testverfahren zur Erfassung der aktuellen alkylierenden Potenz einer Verbindung. Auch im Inkubationsversuch von Schmähl und Druckery an lebenden Krebszellen ist eine zytotoxische Wirkung in vitro nicht nachgewiesen. Die Krebszellen werden hier mit Prüfsubstanzen inkubiert und nach Entfernen der Wirkstoffe auf unbehandelte Versuchstiere transplantiert. Hierbei ist die Angehrate ein Maß für die zytotoxische Aktivität der Substanzen.

Dagegen ist Cyclophosphamid in vivo, wie in vielen Tests bewiesen, hochaktiv. So wurde zum Beispiel die Wirksamkeit von Endoxan^R zusammen mit anderen Chemotherapeutika an 8 experimentellen Tumoren der Ratte (Yoshida-Aszites Sarkom, T-Sarkom usw.) nachgewiesen. Danach führt Cyclophosphamid bei den Inzuchttumoren schon bei niedrigen Dosen (3 - 4,5 TE = 3 - 4,5 % der LD 50) zur endgültigen Heilung (Druckery, Steinhoff, Nakayama 1963).

In der Therapie der menschlichen Tumoren findet Endoxan^R hauptsächlich Anwendung bei malignen Systemerkrankungen wie:

Lymphogranulomatose (Morbus Hodgkin), Lymphosarkom (lymphozytisch-lymphoblastisches Lymphom), Retikulosarkom (immunoblastisches Lymphom) und Morbus Waldenström (Schwenkenbecker 1959, Algenstaedt 1963, Bouroncl, Datta und Frajola 1964).

Die malignen soliden Tumoren, so zum Beispiel das Ovarialkarzinom, das Mammakarzinom, Bronchialkarzinom und Seminom zeigen nach längeren Behandlungen ebenfalls Remissionen (Boeckl 1964, Schnetzer 1969, LeMeeus-Bith et al. 1968).

So zählen auch die Autoimmunerkrankungen zu den Indikationsgebieten (Goldbeck 1965, Bianchi und Gallo 1962).

Da wie oben bereits erwähnt, Cyclophosphamid in vitro inaktiv, in vivo aber starke kanzerotoxische Wirkung aufzeigt, ist eine Umsetzung zur eigentlichen Wirkform im Organismus Voraussetzung für den therapeutischen Effekt.

Durch isotopentechnische Methoden konnten beim Menschen im Blutserum nach 2 - 4 Stunden alkylierende Substanzen nachgewiesen werden (Bagley, Boszick und de Vita 1973).

Zur Feststellung, wo die Aktivierung im Organismus erfolgt, d. h. die Überführung der Transport- in die

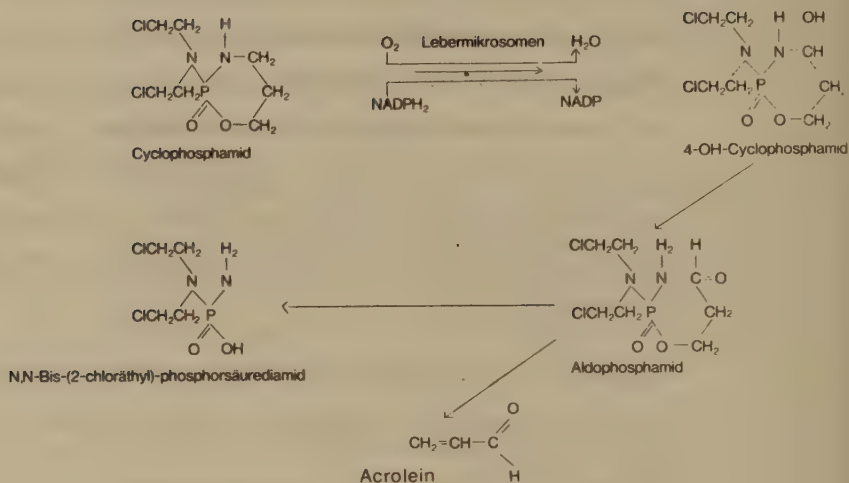
Wirkform, wurden vor allem Untersuchungen an der Leber durchgeführt. Brock und Hohorst stellten fest, daß die bei leberlosen Ratten im Serum erreichte zytostatische Aktivität nach Verabreichung von Cyclophosphamid nur 15 - 20 % der bei Normaltieren war. Zellfraktionierungsversuche zeigen, daß vor allem die Mikrosomen der Leber Endoxan aktivieren können. Sie benötigen hierfür reduziertes Triphosphopyridindinukleotid und Sauerstoff.

Die Aktivierung ist eine Bestätigung für das geforderte Prinzip nach dem Übergang der Transportform in eine Wirkform.

Der Abbau des Cyclophosphamids läuft nach den gegenwärtigen Vorstellungen wie in Abbildung 2 (aus Völker 1974) beschrieben. Hieraus wird ersichtlich, daß Cyclophosphamid in den Lebermikrosomen unter Beteiligung von Sauerstoff und dem Pyridinnukleotid NADH H zu 4- OH Cyclophosphamid oxydiert wird, das sich unter Aufgabe der Ringstruktur zu dem Tautomer Aldophosphamid umwandeln kann.

Aus diesen primären Aktivierungsprodukten entsteht in der Zelle nach anschließender Hydrolyse der Phosphorsäureesterbindung N, N Bis- (2 -chloräthyl) phosphorsäurediamid und Acrolein.

Abb.: 2 Abbau von Cyclophosphamid aus Völker 1974



Die stärkste Wirkung gegenüber Krebszellen soll das Tautomerenpaar 4- Hydroxycyclophosphamid/Aldophosphamid und N, N-Bis (2- chloräthyl) -phosphorsäurediamid besitzen (Hohorst 1971). Alarcon und Meienhofer (1971) sind der Ansicht, daß der beim Abbau entstehende stark zytotoxisch wirkende Aldehyd Acrolein für die tumorhemmende Wirkung entscheidend ist.

Als weitere Metabolite des Cyclophosphamid wurden 4 Oxo-Cyclophosphamid (Ketocyclophosphamid) und Carboxyphosphamid im Serum und im Urin nach Endoxan-Applika-

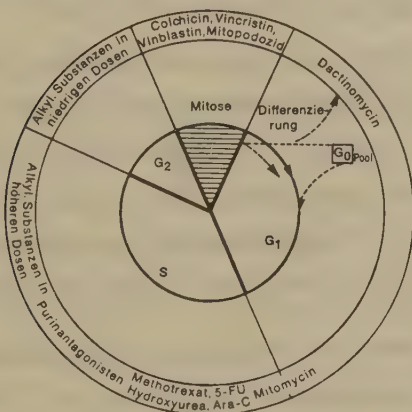
tion nachgewiesen, wobei nur Carboxyphosphamid, welches durch enzymatische Dehydrierung aus Aldophosphamid entsteht, noch geringe zytotoxische Wirkung besitzt.

4 Oxo-Cyclophosphamid dagegen ist keine alkylierende Verbindung und kann auch in der Leber nicht weiter zu einer alkylierenden Substanz umgewandelt werden (Hohorst und Ziemann 1971).

III Reaktionsmechanismen alkylierender Agenzien

Alkylierende Substanzen greifen, wie aus einem Schema von Gross ersichtlich, in der G₂ bzw. S-Phase des Zellzyklus ein.

Abb.: 3 Generationszyklus der Zelle (Gross 1977)



Die Abbildung 3 zeigt, daß der Angriffspunkt der Alkylantien, so auch der von Cyclophosphamid (Müller 1975), sowohl in der Zeit der Reduplikation der DNA (S-Phase), als auch in der anschließenden Vorbereitungsphase auf die Zellteilung liegen kann.

Unter Alkylierung einer chemischen Verbindung versteht man eine chemische Reaktion, bei der ein Wasserstoffatom der Verbindung durch eine Alkylgruppe ersetzt wird. Es handelt sich um eine sogenannte Substitutionsreaktion. Die biologisch aktiven Alkylantien übertragen die Alkylgruppe mit lokalem Elektronenüberschuß auf das nucleophile Zentrum (lokaler Elektronenüberschuß) des Substratmoleküls.

Nucleophile Zentren sind außer Aminogruppen auch Phosphorsäureester-Gruppen. Bei Alkylierungsprozessen mit Stickstofflostderivaten spielen cyclische Zwischenstufen der Alkylantien eine Rolle. Im wäßrigen Milieu bilden sich Ringverbindungen, bestehend aus zwei Kohlenstoffatomen und einem Stickstoffatom. Diese Ringverbindungen zeichnen sich durch eine hohe Reaktionsfähigkeit aus, da sie den Charakter von außerordentlich instabilen und reaktionsfähigen elektrophilen Zwischenstufen, sog. Carbenium-Ionen, haben.

Abbildung 4 zeigt eine Alkylierungsreaktion über diese Ringverbindung.

Man unterscheidet monofunktionelle Alkylantien, die in der Lage sind, maximal 1 Substratmolekül zu alkylieren, und bie- sowie polyfunktionelle Alkylantien, die 2 und mehr Substratmoleküle alkylieren können.

Für die Alkylierung der DNA sind nun grundsätzlich mehrere Möglichkeiten in der Diskussion.

So z. B. die Reaktion des Alkylrestes mit dem N 1, N 3 und N 7 des Adenin, dem N 6 und N 7 des Guanin und dem N 1 des Cytosin (Shapiro 1969, Abb. 5).

Nach Bautz und Freese erfolgt die Substitution der Alkylreste fast ausschließlich in N 7 - Position des Guanin (Abb. 6). Handelt es sich um ein monofunktionelles Agens, so entsteht ein quarternäres N-Atom im Puringerüst. Dies kann zur Depurinisierung führen. Das depurinisierte Guanin kann während der Replikation nicht mehr als Base erkannt werden, so daß an diese Stelle jede beliebige Base eingesetzt werden kann.

Bifunktionelle Alkylantien können zusätzlich Diguanin-alkyl bilden, wobei es zu einer Vernetzung (Crosslink) kommt. Dies ist sowohl zwischen den beiden Strängen der DNA (intrastrand crosslink), als auch zwischen zwei Helices (interstrand crosslink) möglich (Abb. 7).

Es ist damit zu rechnen, daß crosslinks sowohl die Replikation der DNA, als auch die Funktion und Verteilung der DNA beeinträchtigen (Rieger und Michaelis 1967).

So kann an der Stelle der Quervernetzung (crosslink) der beiden antiparallelen Stränge, während der DNA-Neusynthese die DNA-abhängige DNA-Polymerase nicht aktiv werden. Als Folge davon kommt es zu einem Synthesestop, dem Strangbrüche an dem geschädigten DNA-Abschnitt folgen können.

Neben Vernetzungen der beiden DNA Stränge oder verschiedenen DNA Strängen werden durch bifunktionelle Alkylantien auch Vernetzungen zwischen DNA-Makromolekülen und umgebenden Proteinen hervorgerufen. Die Alkylantien reagieren bevorzugt mit den Carboxylgruppen von Asparagin und Glutaminsäure (Müller 1975).

Nach Befunden von Ross (1953, 1958, 1962) ist auch eine Alkylierung der Phosphoribosylgruppe der DNA möglich. Zusätzlich ist eine Transalkylierung des Alkylrestes vom Phosphat auf den N 7 des Guanin denkbar (Abb. 8).

Im Verlauf der Phosphatalkylierung entstehen instabile Phosphattriester, deren Hydrolyse meist wieder zur Freisetzung des alkylierenden Radikals führt. In seltenen Fällen kommt es zur Hydrolyse zwischen dem Zucker und der Phosphatgruppe, wobei das Zucker-Phosphatrückgrat der DNA bricht (Röhrborn 1960), Abb. 9.

Abb. 4: Alkylierungsreaktion über Ringverbindungen

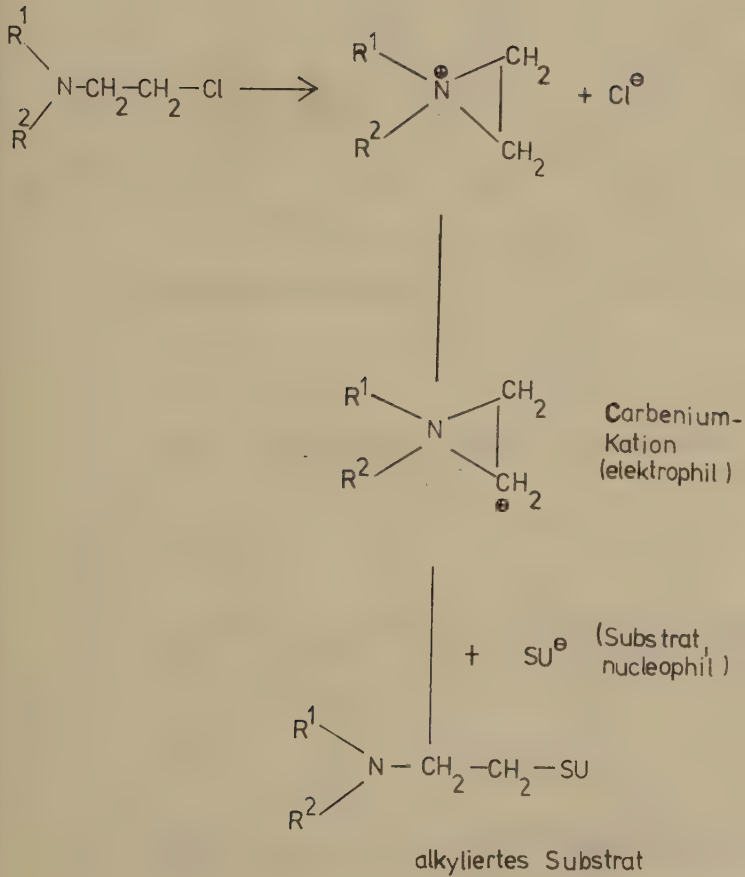
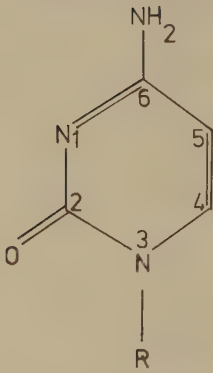
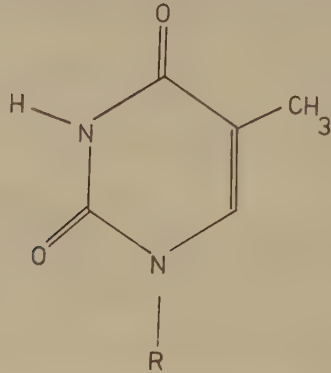


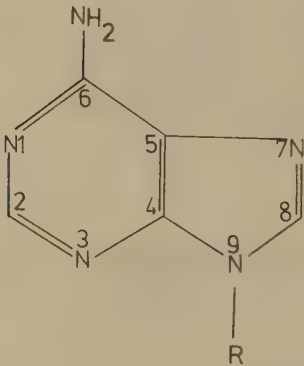
Abb. 5: Pyrimidin- und Purinbasen der DNS



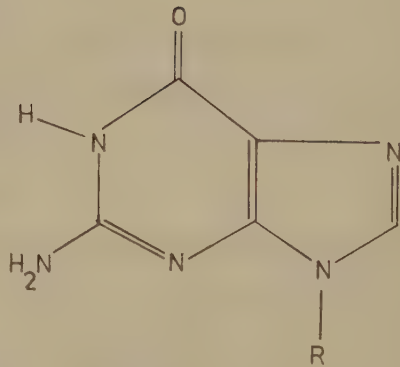
Cytosin bzw. Cytidin



Thymin bzw. Thymidin



Adenin bzw. Adenosin



Guanin bzw. Guanosin

Abb. 6: Bildung von N-7 Alkylguanin (Bautz und Freese 1960)

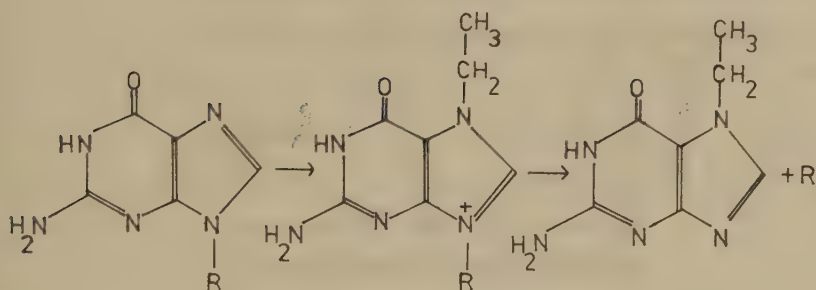


Abb. 7: Schematische Darstellung der beiden Crosslinktypen

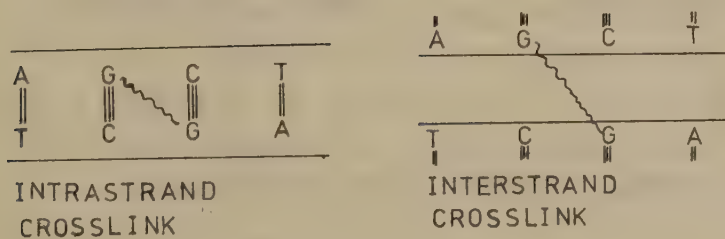


Abb. 8: Transalkylierung, x = Alkylrest

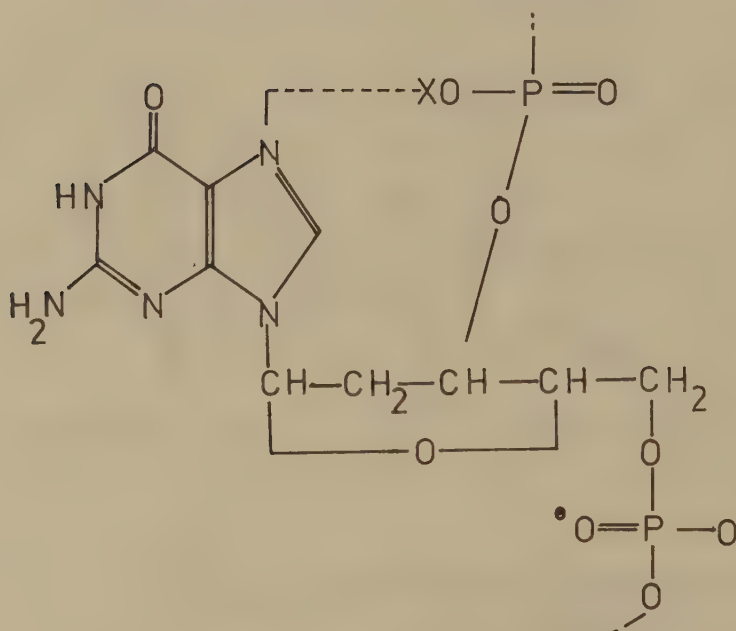
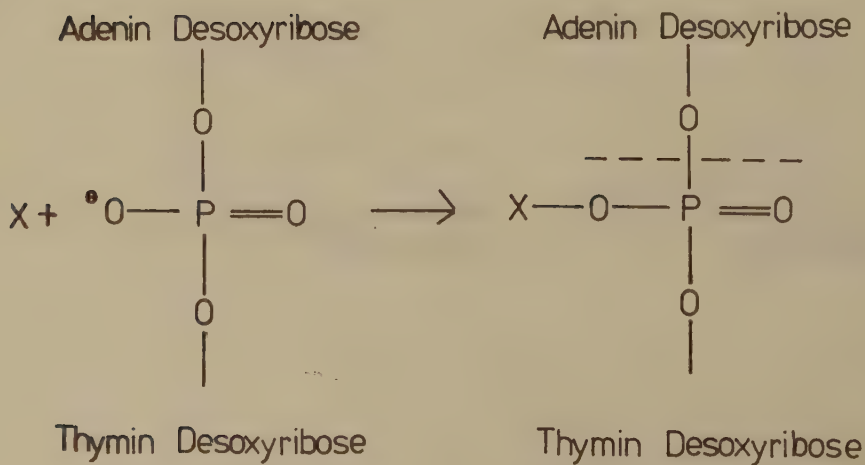


Abb. 9: Bruch zwischen Desoxyribose und Phosphat



IV Toxikologie von Cyclophosphamid

Die akute Toxizität von Cyclophosphamid ist verhältnismäßig gering. Die DL 50 erreicht deshalb für die im folgenden aufgeführten Kleinsäuger recht hohe Werte.

Maus	400 mg/kg ip.
Ratte	150 mg/kg ip.
Meerschweinchen	400 mg/kg iv.
Chin. Hamster	400 mg/kg ip.

Die Werte für Maus, Ratte und Meerschweinchen stützen sich auf Angaben des Herstellers. Die Ermittlung der LD 50 für den chin. Hamster wurde von Herwig 1973 durchgeführt.

Im weiteren soll an Hand von einigen Literaturhinweisen die spezielle Toxizität noch erläutert werden.

Biraben und Delmon stellten bei hohen Cyclophosphamidgaben an Ratten eine anfängliche Atrophiephase der Milz, eine Schädigung des Leberparenchyms und eine Leukopenie mit einem Abfall der Leukozyten von 16 000 auf 4 000/ccm fest. Jedoch waren diese Schäden reversibel und lagen deutlich unter denen anderer Zytostatika (Biraben und Delmon 1963).

Nach Palme und Liss (1963) wird die Hemmung der In-

korporation von 3 H Thymidin und 32 P in die DNA von Darm, Zunge, Leber und Tumorzelle nach Verabreichung seiner subletalen Dosis als Hemmung der DNA-Biosynthese angesehen.

Bei jugendlichen Mäusen ergab sich nach Applikation von verschiedenen Dosen von Endoxan^R vorwiegend eine Beeinflussung der reifen Zellen des Knochenmarkes, während die Wirkung von der lymphatischen Reihe über die myeloischen Zellen und die Thrombozyten bis zu den Erythrozyten abnahm (Scaltrini, Tognella, Conigliaro und Grifoni 1962).

Auch beim Menschen führt Cyclophosphamid zu ausgeprägten Leukopenien mit einem Absinken der Leukozyten auf Werte von 2 000 - 3 000/ccm (d'Ambrosio, Fontana-Donatelli 1963). Die Beeinflussung der Erythropoese durch Cyclophosphamid wird in der Literatur unterschiedlich beurteilt. So kommt es nach Untersuchungen von Maus nach dreimaliger Applikation von 100 mg/kg Körpergewicht bei der Ratte zu einer Hemmung der Erythropoese.

Benjamin beobachtete 1963 zwar den bekannten leukotoxischen Effekt, konnte aber eine Beeinflussung der Erythro- und Thrombopoese beim Menschen nicht feststellen.

Eine weitere oft nicht gewünschte Nebenwirkung ist die immunsuppressive Wirkung, die durch gleichzeitige Gabe von Antibiotika aber weitgehend neutralisiert werden kann (Potel 1972). Vorübergehende Erscheinungen wie Alopezie, Übelkeit und Erbrechen können ebenfalls Folgen der Cyclophosphamid - Medikation sein.

B Material und Methoden

In allen drei Verfahren dienten 10 - 12 Wochen alte chin. Hamster (*Cricetulus griseus*) als Versuchstiere. Insgesamt wurden 34 Tiere behandelt und untersucht. Es ergibt sich folgende Verteilung:

Knochenmark	3 Männchen	3 Weibchen
Mikronukleus:	3 Männchen	3 Weibchen
Spermatogonien:	5 Männchen	

Zusätzlich wurde die gleiche Zahl Versuchstiere für eine Kontrolle aufgearbeitet. Sie wurden in einem klimatisierten Tierstall zu dritt in einem Normkäfig gehalten und waren vor und während des Versuchs keinen besonderen Stressfaktoren ausgesetzt.

Fünfmal wurde den Tieren im Abstand von 24 Stunden eine Dosis von 40 mg/kg Körpergewicht Cyclophosphamid intraperitoneal verabreicht. Die Einzeldosis entspricht 3/30 der LD 50. Zur Herstellung der Injektionslösung wurden handelsübliche Flaschen mit 100 mg Endoxan Trockensubstanz Inhalt benutzt. Die 100 mg wurden in 5 ml Aqua bidest. aufgelöst und anschließend mit physiologischer Kochsalzlösung auf 50 ml Injektionslösung aufgefüllt. Aus den 50 ml wurde die pro Tier zu applizierende Menge bestimmt. Die Aufarbeitung bzw. die Tötung der Tiere erfolgte 12 Stunden nach der

letzten Applikation mit Äther. Im Spermatogonienversuch wurde zusätzlich viereinhalb Stunden vor der Aufarbeitung 0,1 mg Colcemide pro 10 g Körpergewicht und im Knochenmarkversuch 2 Stunden vorher dieselbe Dosis ip. gespritzt.

Versuchsablauf:

Spermatogonienversuch:

Applikationen	I	II	III	IV	V	Aufarbeitung
Zeit (Stunden)	1	24	48	72	96	108 -4,5 Colcemide

Knochenmarkversuch:

Applikationen	I	II	III	IV	V	Aufarbeitung
Zeit (Stunden)	1	24	48	72	96	108 -4,5 Cocemide

Mikronukleusversuch:

Applikationen	I	II	III	IV	V	Aufarbeitung
Zeit (Stunden)	1	24	48	72	96	108

I Chromosomendarstellung durch Präparation von Knochenmark

1. Allgemeines:

Das Knochenmark des Säugers ist ein Organ mit vorwiegend regenerativen Aufgaben. Während die Blutbildung beim Embryo noch in den Blutinseln, die aus Wandungen der Kapillaren im mittleren Keimblatt entstehen, erfolgt, wird sie im postfetalen Leben vom Knochenmark übernommen. Sie findet vor allem zwischen den Bälkchen und der Spongiosa statt. Nach dem Abschluß des Längenwachstums verfetten die großen Markräume der Röhrenknochen durch Einlagerung von Lipiden in die retikulären Bindegewebszellen, und die weitere Blutbildung beschränkt sich nun auf die platten Knochen, z. B.: Scapula, Clavicula u. a..

Alle Blutzellen entstehen aus der undifferenzierten Mesenchymzelle des retikuloendothelialen Systems, RES, dem Hämoistioblasten.

Aus diesem entwickelt sich im hämopoetischen Gewebe der Hämozytoblast, die sog. Stammzelle, aus der sich dann die erythropoetische, myeloische und megakaryotäre Reihe bilden kann.

Die Hämoopoese wird also entsprechend ihren Endproduk-

ten unterteilt in:

- a. Erythropoese
- b. Granulopoese
- c. Thrombopoese

zu a.: In der Erythropoese entsteht aus dem Hämozytoblasten ein ebenfalls stark basophiler Proerythroblast. Die Basophilie geht auf die Ribosomen zurück, doch fehlen der Zelle endoplasmatisches Retikulum und Golgiapparat. Später bildet der Erythroblast den roten Blutfarbstoff Hämoglobin und ändert damit seine Färbbarkeit. Die hämogobinhaltigen Erythroblasten besitzen noch einen Zellkern; die folgenden Zellteilungen führen zu Normoblasten, die nach Ausschleusung des Kerns Normozyten genannt werden.

zu b.: Die Granulopoese bringt aus dem Hämozytoblasten den Myeloblasten hervor, der ein stark basophiles Zytoplasma besitzt. Die Zelle wandelt sich zum sog. Promyelozyten, dessen Kern chromatinreich ist. Im folgenden Myelozyten treten neutrophile, eosinophile und basophile Körnchen auf. Von dieser Entwicklungsstufe an lassen sich entsprechend den Granula drei Entwicklungsreihen, neutrophile eosinophile und basophile Granulopoese, unterscheiden, die prinzipiell gleich verlaufen und über den Metamyelozyten zum segmentkernigen Granulozyten führen.

zu σ .: Die Stammzelle der megakaryozytären Reihe, der Megakaryoblast, kann mehrere Kerne enthalten, die durch mitotische Kernteilung ohne entsprechende Teilung des Zytoplasmas entstehen. Der Megakaryozyt ist die größte im Knochenmark auffindbare Zelle. Die Zellgrenze ist unregelmäßig und zeigt in den späten Reifungsstadien eine Differenzierung von granulierten Plättchen und pseudopodienartigen Strukturen. Die Blutplättchen (Thrombozyten) schließlich sind kleine Protoplasmafragmente, die sich von der Peripherie der Megakaryozyten ablösen.

Die Lebensdauer der Erythrozyten beträgt beim Menschen etwa 100 Tage, die der Granulozyten etwa 10 Tage und die der Thrombozyten etwa 7 Tage. Hieraus ergibt sich die hohe Mitoserate des Knochenmarkes. Die Mehrzahl der beobachteten Mitosen gehört überwiegend der erythropoetischen Reihe an.

Da sich die große Zahl der Mitosen leicht in Metaphasenplatten darstellen lassen, empfiehlt es sich, das Knochenmark für die chromosomale Analyse zu benutzen. Tabelle 1 zeigt am Beispiel der Erythropoese und Granulopoese des Menschen die Stadien der häufigsten Mitosen.

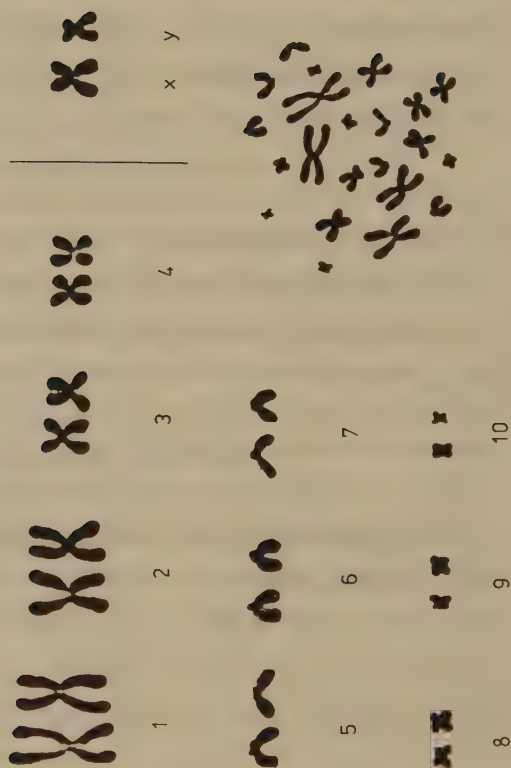
Tabelle 1: Granulo- und Erythropoese

<u>Granulopoese</u>	<u>Erythropoese</u>
Hämozytoblast	Hämozytoblast
Myeloblast	Proerythroblast Mitose
Promyelozyt Mitose	Erythroblast Mitose
Myelozyt Mitose	Normoblast
Metamyelozyt	Normozyt
Stabkerniger Granulozyt	
Segmentkerniger Granulozyt	

Der Karyotyp des chinesischen Hamsters ist durch seine geringe Chromosomenzahl, $2n = 22$, und gute Differenzierbarkeit der einzelnen Paare für Chromosomenuntersuchungen gut geeignet (Schmid und Boller 1974 und 1970).

Der Chromosomensatz besteht aus 4 großen metazentrischen, 3 akrozentrischen und drei kleinen metazentrischen Chromosomenpaaren, sowie den Geschlechtschromosomen (siehe Abb. 10).

Abb. 10: Karyotyp des chin. Hamsters



2. Technik der Präparation

Zwei Stunden vor der Aufarbeitung, also zehn Stunden nach der 5. Applikation, erfolgte die intraperitoneale Injektion von 0,1 mg Colcemide pro 10 g Körpergewicht.

Die Präparation des Knochenmarkes und die Herstellung der Präparate verlief nach der Methode von Schmid und Staiger (1969).

1. Die Tiere werden mit Äther getötet.
2. Mit einem Schnitt auf der Streckseite wird der Oberschenkel mit seiner Muskulatur freigelegt.
3. Tibia und Femur-Ilium Verbindung werden durchtrennt.
4. Die Muskeln werden stumpf präpariert.
5. Die distale Epiphyse wird abgezogen und mit ihr der Rest der Tibia und die umgebende Muskulatur.
6. Das proximale Ende des Femur wird abgeschnitten, so daß der Knochenmarkskanal offenliegt.
7. Das Knochenmark der beiden Femura wird mit einer Spritze (Nadel-Nr. 1) und 2 ml raumtemperierter Hankslösung in ein silikonisiertes Zentrifugenröhrchen ausgespült.
8. Das Material wird gut aufpipettiert und bei 1 000 rpm (Heraeus Christ Tischzentrifuge) zentrifugiert.

9. Der Überstand wird mit der Pipette entfernt.
10. Zur hypotonen Behandlung werden unter ständigem Aufpipettieren mit der Pasteurpipette 1,8 ml eisgekühltes Aqua bidest. zugegeben. Anschließend wird das Material 15 Minuten ins Eisbad gestellt, wobei alle 5 Minuten aufpipettiert wird.
11. 5 Minuten Zentrifugation bei 1 000 rpm, dann Abziehen des Überstandes und Aufklopfen des Sedimentes.
12. Zur Fixierung werden 2 ml eines frisch zubereiteten Essigsäure-Methanol Gemisches (1 : 3) dem Sediment unter ständigem Aufklopfen zugesetzt.
13. Nach 10 Minuten wird das Fixativ gewechselt und die Suspension in einem verschlossenem Zentrifugenröhrchen 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt.
14. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 1 000 rpm wird der Überstand abpipettiert und tropfenweise frisches Fixativ zugegeben bis eine milchige Suspension entsteht. Diese wird eisgekühlten Objektträgern aufgetropft, die über dem Bunsenbrenner abgeflammt werden.
15. Die luftgetrockneten Präparate werden in 5 %iger Giemsalösung 10 Minuten gefärbt, mit Aqua dest. gespült und erneut getrocknet.
16. Nach 30-minütigem Xylolbad werden die Präparate mit Eukitt eingedeckelt.

3. Auswertung

Vor der Auswertung wurden die Präparate, sowohl Versuchs- als auch Kontrollserie, von einem Mitarbeiter des Institutes codiert. Zum Auffinden der Metaphasen reichte eine 160fache Vergrößerung. Die Untersuchung erfolgte unter 1 000facher Vergrößerung. Ausgewertet wurden nur Metaphasen mit 22 ± 2 Chromosomen. Pro Tier wurden 200 Metaphasen folgenden Kriterien unterworfen:

1. Numerische Aberrationen

Aneuploide Metaphasen mit mehr als 22 ± 2 Chromosomen wurden nicht gewertet, ebenso polyploide Metaphasen.

2. Strukturelle Aberrationen (siehe Abbildungen im Ergebnisteil)

a. Lokale Achromasien = Gap (s)

Gaps in einer Chromatide

Gaps in beiden Chromatiden = Isochromatidengaps

Nach Gebhardt sind Gaps färberische Lücken in Chromosomen bzw. in einer Chromatide, die optisch zu einem Substanzverlust ohne Verlust der Kontinuität der Chromatinstruktur führen (Gebhardt 1974).

b. Brüche

Chromatidenbruch B'

Chromosomenbruch B''

Eine Diskontinuität des Chromosoms oder der Chromatide mit einem azentrischen Fragment.

Der Zusammenhang mit einem Exchangeprozeß darf nicht gegeben sein (Savage 1975).

c. Fragmente

Chromatidenfragment F'

Chromosomenfragment F''

Azentrische Chromatiden- und Chromosomenstücke

d. Deletionen

Chromatidendeletion D'

Chromosomendeletion D''

Stückverlust auf Chromosomen- oder Chromatiden-
ebene

e. Exchange Figuren

1. Intrachange

Veränderung innerhalb eines Chromosoms
(Ringchromosom)

2. Interchange

Veränderung zwischen zwei oder mehreren Chromosomen auf Chromatidenebene I'

Veränderung zwischen zwei oder mehreren Chromosomen auf Chromosomenebene I''

f. Multiple Aberrationen

Metaphasen mit mehr als 5 Aberrationen

g. Pulverisationen und Fragmentationen

Die Chromosomen sind zerstückelt und einzelne Chromosomen sind selten zu erkennen. Der Übergang zwischen multiplen Aberrationen, Fragmentationen und Pulverisationen ist fließend.

Besonderheit:

Das x-Chromosom des chin. Hamsters trägt am langen Arm eine Sekundärstriktur. Dieses wurde nur dann als Gap gewertet, wenn das x-Chromosom gleich bzw. kleiner als das 3. und 4. Chromosomenpaar war und die Sekundärstriktur nur eine Chromatide betraf (Röhrborn pers. Mitteilung).

Nach den Theorien von Sax (1938, 1940, 1941) und Rieger und Michaelis (1967) werden Exchanges und Deletionen auch unter dem Begriff Reunionsfiguren zusammengefaßt.

Jede aberrante Metaphase wurde zur Dokumentation photographiert und die Negative auf das Format 8,9 x 12,7 cm vergrößert.

II Chromosomendarstellung durch Präparation der Hodentubuli

1. Allgemeines

Im Parenchym der Tubuli seminiferi contorti des Hodens liegen zwei Zellarten: 1. Sertoli-Zellen, die ein stützendes und ernährendes Grundgewebe bilden. 2. Zellen der Spermiogenese, die von den Spermatogonien, den Ursamenzellen, ausgehen. Diese liegen der Basalmembran eines solchen Tubulus seminiferus contortus direkt an. Sie teilen sich mitotisch, setzen den Spermatogonienstamm fort und entwickeln sich nach einer Wachstumsperiode zu Spermatozyten.

Die Proliferationsrate der Tochterzellen läßt auch dieses Gewebe für eine Untersuchung auf mutagene Eigenschaften einer Substanz im Rahmen einer chromosomalen Analyse für geeignet erscheinen.

Die bei allen Nagetieren ähnlich verlaufende spermatogoniale Entwicklung umfaßt mehrere Stadien. Mit der Bildung der Stammzellspermatogonie aus den primordialen Keimzellen beginnt der Abschnitt der Spermatogenese.

Die Spermatogenese hat ihren Anfang mit vier aufeinanderfolgenden mitotischen Teilungen der Stammzellen

(As Spermatogonien). Aus der 4. Spermatogoniengeneration entstehen nach einer weiteren mitotischen Teilung die Intermediärspermatogonien, die sich schließlich zu B-Spermatogonien umwandeln (Leblond und Clermont 1952).

A-Spermatogonien: Große einfache Zellen mit ovalem Kern und staubartig granuliertem Chromatin, weshalb sie auch Staubspermatogonien genannt werden.

B-Spermatogonien: Kleinste Spermatogonien die auftreten; sie haben einen dunklen Kern mit einer großen Chromatinmasse. Man nennt diese Zelle deshalb auch Krustenspermatogonie.

In-Spermatogonien: Die Größe dieser Spermatogonien bewegt sich zwischen der Größe der A- und B-Spermatogonien.

In den letzten mitotischen Teilungsschritten entstehen schließlich aus den B-Spermatogonien die sog. primären oder Ruhespermatogonien (Spermatozyten 1. Ordnung). Die Spermatozyten 1. Ordnung treten nun in die Prophase der 1. meiotischen Teilung ein, durchlaufen Leptotän, Zygotän, Pachytän und Diplotän. Nach der Reduktionsteilung in der Diakinese-Metaphase I und Bildung der

Spermatozyten II. Ordnung folgt die zweite meiotische Teilung (Äquationsteilung) aus der 4 haploide Spermatiden hervorgehen.

Tabelle 2 gibt am Beispiel des chin. Hamsters eine Übersicht über die Entwicklung der männlichen Keimzelle.

Im weiteren ist immer nur von der Darstellung der Spermato gonien-Metaphasen die Rede, da auf eine Spezifizierung in A-, In- und B-Spermato gonien verzichtet wurde.

Tabelle 2: Spermiohistogenese, Spermatogenese und
Spermiogenese des chin. Hamsters

Spermiohistogenese	Primordiale Keimzellen
	As-Spermatogonien
	In-Spermatogonien
	B-Spermatogonien
Spermatogenese	Spermatozyten I. Ordnung
	Meiose
	Leptotän
	$2n = 22$
	Zygotän
	Pachytän
	Diplotän
	Diakinese
	Anaphase
	Telophase
	Spermatozyten II. Ordnung
	$n = 11$
	Interkinese
	Metaphase II
	Telophase II
	Spermatiden
Spermiogenese	Spermien

2. Technik der Präparation

4 - 5 Stunden vor der Aufarbeitung wurde den Tieren 0,1 mg Colcemide auf 10 g Körpergewicht ip. verabreicht. Zur Präparation der Spermatogonien wurde die Methode von Schleiermacher (1967) modifiziert.

1. Die Tiere werden mit Äther getötet.
2. Ein Hoden wird vorsichtig freipräpariert und auf ein vorgewärmtes Uhrglas (37 Grad C) gegeben.
3. Die Tunica Albuginea wird zerschnitten und die Tubuli mit einer gebogenen Schere sorgfältig zerkleinert.
4. 1 ml einer warmen 0,8 %igen Natriumcitrat-Lösung wird zu den Tubuli gegeben.
5. Anschließend werden die Tubuli in ein ebenfalls vorgewärmtes Zentrifugenröhrchen gegeben, 0,8 %ige Natriumcitrat-Lösung wird zupipettiert. Die Suspension wird vorsichtig aufpipettiert.
6. Man läßt die Suspension 4 Minuten sedimentieren.
7. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und das Sediment in 10 ml frischer hypotoner Lösung resuspendiert. Die Dauer der gesamten hypotonen Behandlung soll 8 Minuten nicht überschreiten.
8. Die Suspension wird für 0,5 Minuten bei 1 000 rpm (Heraeus Christ Tischzentrifuge) zentrifugiert, der Überstand wird dekantiert. Das Sediment be-

steht überwiegend aus Tubulifragmenten.

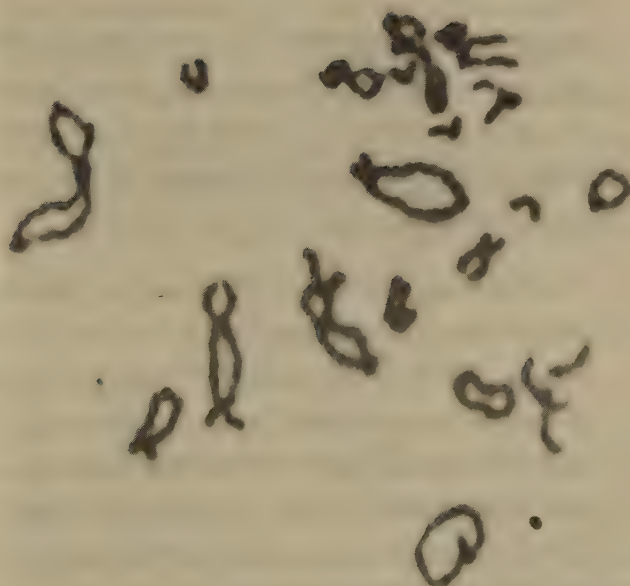
9. Tropfenweise wird nun 10 ml Äthanol/Eisessig (3 : 1) als Fixativ zugegeben und anschließend vorsichtig durchpipettiert.
10. Die Röhrchen werden mit Parafilm abgedeckt und 2 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt.
11. Die Fixierlösung wird dekantiert und der Fixiervorgang mit frischem Fixativ wiederholt. Die Röhrchen werden nun über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt.
12. Am darauffolgenden Morgen wird die Suspension 10 Minuten bei 1 000 rpm zentrifugiert und anschließend der Überstand dekantiert.
13. Es erfolgt ein nochmaliges Fixieren mit wenig Fixativ. Durch Klopfen gegen das Röhrchen werden die Tubuli nach oben gewirbelt.
14. Herstellen der Objektträger:
Die am Boden verbliebene Suspension wird auf kalte und nasse Objektträger aufgetropft.
15. Die Präparate werden luftgetrocknet.
16. Die Präparate werden für 5 Minuten in Methanol gestellt und anschließend 15 Minuten in 5 %iger Giemsalösung gefärbt und in Aqua dest. gespült.
17. Die Objektträger werden abermals luftgetrocknet und mit Deckgläsern versehen.

3. Auswertung

Pro Tier wurden 100 Metaphasen analysiert. Die Auswertung der Metaphasen erfolgte nach denselben Kriterien wie unter der Methode Knochenmark beschrieben.

Vereinzelt wurden Spermatozyten I. Ordnung in der Reduktionsteilung gefunden. Sie waren nicht Gegenstand der Untersuchung; ihre Aberrationen wurden also nicht gewertet. Da sie bei ungenügender zytogenetischer Erfahrung Anlaß zu Verwechslungen mit den multiplen Aberrationen bieten können, sind sie in Abb. 11 dargestellt.

Abb. 11: Meiotische Teilungsphase,
Diakinese Metaphase I



III Der Mikrokerntest

1. Allgemeines

Das Knochenmark ist, wie eben schon erwähnt, ein Organ mit hoher Proliferationsrate, die in der Hauptsache durch Zellen der Granulopoese und Erythropoese zustande kommt.

Untersucht man Knochenmarksausstriche von Säugetieren, die mit chromosomenbrechenden Agenzien behandelt worden sind, so kann man in den Zellen der roten und weißen Reihe einige mit sog. Mikrokerne finden (siehe Abbildung im Ergebnisteil).

Die Entstehung dieser Mikrokerne, die meist ein Anhängsel des eigentlichen Kerns sind und im Cytoplasma liegen, hat folgende Ursache: Kommt es zum Beispiel durch ein alkylierendes Agens zu Brüchen von Chromatiden und Chromosomen, so bleiben azentrische Chromatidenbruchstücke in der Spindelebene liegen, wenn in der Anaphase die Chromosomen zu den Polen wandern.

In der Telophase bilden die liegengebliebenen Fragmente einen oder mehrere Nebenkerne aus, die sehr viel kleiner als die Hauptkerne sind und deshalb Mikrokerne genannt werden (Schmid 1975). Ihre Größe beträgt ca. $1/20 - 1/5$ der eines Erythrozyten. Sie sind in Myelo-

blasten, Myelozyten, Erythroblasten und in poly- und normochromatischen Erythrozyten nachweisbar. Bei Anwendung des Mikrokerntests macht man sich die Tatsache zu Nutze, daß die Zellen der roten Reihe in dem Stadium des Erythroblasten ihren Zellkern ausstoßen, die Mikrokerne aber aus noch ungeklärten Gründen in den Zellen verbleiben.

Die jugendlichen Erythrozyten färben sich in Giemsa-präparaten blaurot, polychromatisch, während die reifen Erythrozyten eine rote Farbe, normochromatisch, abnehmen. Sowohl in den polychromatischen, als auch in den normochromatischen Zellen sind Mikrokerne leicht zu erkennen, da der Hauptkern ausgestoßen ist.

2. Technik der Präparation

Vor der Aufarbeitung der chin. Hamster wurde im Gegensatz zu Mohr (1978) und Tates und Natarajan (1976) kein Colcemide appliziert, da nach Schmid die Verwendung von Mitosegiften mikrokernähnliche Erscheinungen hervorrufen kann (Schmid 1975).

Zur Gewinnung des Knochenmarkes wurden wieder Oberschenkel von jugendlichen Hamstern benutzt. Die Präparation erfolgte nach der Methode von Schmid (1975).

1. Ein silikonisiertes Zentrifugenröhrchen wird mit fetalem Kälberserum gefüllt und davon 0,2 ml in eine Spritze aufgezogen.
2. Die Nadel wird in den proximalen Teil des frei-präparierten Femur gesteckt.
3. Der Femur wird in das Serum getaucht und durch den Druck auf den Spritzenkolben das Knochenmark in das Serum gespritzt.
4. Nun wird die Nadel in das distale Ende gesteckt und der Vorgang wiederholt.
5. Anschließend wird zur Herstellung einer feinen Suspension mehrmals angesaugt und ausgestoßen.
6. Bei 1 000 rpm (Heraeus Christ Tischzentrifuge) wird 5 Minuten zentrifugiert.
7. Der Überstand wird mit einer Pipette entfernt.
8. Das Sediment wird mehrmals in den kapillaren Teil der Pasteurpipette gesogen, um eine homogene Mischung zu bekommen.
9. Ein Tropfen dieser Mischung wird auf das Ende eines Objektträgers 3 - 4 cm ausgezogen.
10. Die Objektträger werden luftgetrocknet.
11. Die Präparate werden 5 Minuten in May-Grünwald-lösung gefärbt.
12. Anschließend werden sie 2 Minuten in Aqua dest. gespült.
13. Es folgen die Färbung in Giemsa verdünnt im Ver-

hältnis 1 : 6 mit Aqua dest.

14. Die Präparate werden luftgetrocknet, die Objekt-trägersrückseite mit Methanol gesäubert.
15. Die Präparate werden 5 Minuten in Xylol gestellt und dann mit Eukitt eingedeckt.

3. Auswertung

Unter 1 000facher Vergrößerung wurden Stellen mit mittlerer Zelldichte aufgesucht und nur solche Zellen ausgewertet, die nicht von anderen überlappt wurden. Kernhaltige Zellen, Myeloblasten und Myelozyten wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Eine objektive Schwierigkeit bei der Auswertung war die nicht immer ganz einfache Unterscheidung zwischen reiferen polychromatischen und normochromatischen Zellen.

Bei schwachen Mutagenen umgeht man diese Schwierigkeit, indem man die Zahl der mikrokernhaltigen Zellen auf eine bestimmte Zahl aller Erythrozyten bezieht (Schmid 1975, von Ledebur und Schmid 1973). Da aber Endoxan, wie in der Einleitung schon erwähnt, die Proliferationsrate des Knochenmarks senkt und unter seiner Wirkung das Knochenmark mit peripherem Blut

überschwemmt werden könnte und damit der Anteil der polychromatischen Zellen verdünnt würde, registrierten wir die Zahl mikrokernhaltiger polychromatischer bzw. normochromatischer Erythrozyten getrennt. Ein weiterer Grund für diese Registrierung ist die Existenz einer gewissen, wenn auch geringen Spontanrate von mikrokernhaltigen normochromatischen Erythrozyten.

Mikrokernähnliche Artefakte, wie Farbstoffrückstände und basophile Granula zerstörter Myeloblasten und Myelozyten waren leicht von echten Mikrokernen zu unterscheiden.

Ausgezählt wurden je Tier 1 000 polychromatische und 1 000 normochromatische Zellen, gleichzeitig wurde die Anzahl der mikrokernhaltigen Zellen registriert.

C Ergebnisse der Auswertung

I Chromosomen Analyse im Knochenmark

Die Auswertung der Kontrolltiere, die während des Versuchablaufs unbehandelt blieben, ergab folgendes Ergebnis:

Von den untersuchten 1 200 Metaphasen waren einschließlich Gaps 32, d. h. 2,7 % aberrant und exclusive Gaps nur 7, d. h. 0,6 % (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Gesamtzahl der aberranten Metaphasen

n untersuchte Metaphasen	aberrante Metaphasen incl. Gaps		aberrante Metaphasen excl. Gaps	
	n	%	n	%
1 200	32	2,7	7	0,6

Auf die einzelnen Kontrolltiere bezogen stellt sich die Verteilung der Aberrationen, wie aus Tabelle 4 ersichtlich, dar.

Tabelle 4: Aberrationstypen pro untersuchtes Kontrolltier

Tier Nr.	untersuchte Meta-phasen	aberrante Meta-phasen incl. Gaps	aberrante Meta-phasen excl. Gaps	Fragm.	Brüche	Delet.
1	200	7	1			1
2	200	8	3	1		2
3	200	5	1		1	
4	200	6	1		1	
5	200	2				
6	200	4	1			1

Intrachanges, Interchanges, multiple Aberrationen und Pulverisationen wurden in der Kontrolle nicht gefunden.

Die fünftägige Versuchsdauer überstanden alle Tiere lebend. Die behandelten Tiere verloren im Durchschnitt ca. 1 g Gewicht. Die Tabelle 5 zeigt den Gewichtsverlust der einzelnen Tiere für alle Versuchsreihen.

Tabelle 5: Gewichtsverlust während der Versuchsdauer

		Versuch Knochenmark	Versuch Mikronukleus	Versuch Spermatogonien
männl. Tiere	Nr. 1	0,5 g	1 -,- g	1 0,5 g
	2	1,0 g	2 0,5 g	2 0,5 g
	3	0,5 g	3 1,5 g	3 1,0 g
				4 1,0 g
				5 0,5 g
weibl. Tiere	Nr. 1	0,5 g	1 0,5 g	
	2	1,5 g	2 1,0 g	
	3	1,5 g	3 1,0 g	

Der Allgemeinzustand der Versuchstiere verschlechterte sich während der Behandlung nicht.

Die Auswertung der 1 200 Metaphasen der Versuchstiere (Knochenmark) ergab eine deutliche Steigerung der Zahl aberranter Metaphasen. Inclusive Gaps waren 342 und exclusive Gaps 254 Metaphasen aberrant (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Gesamtzahl der aberranten Metaphasen

n untersuchte Metaphasen	aberrante Metaphasen incl. Gaps		aberrante Metaphasen excl. Gaps	
	n	%	n	%
600 Meta- phasen männl. Tiere	169	28,2	118	19,7
600 Meta- phasen weibl. Tiere	173	28,8	136	22,8
gesamt 1 200	342	28,5	254	21,2

Der zur statistischen Absicherung herangezogene χ^2 Test ergab einen P-Wert von 10^{-10} . Da Werte kleiner als 0,01 signifikant sind, liegt hier eine starke Signifikanz gegenüber der Kontrolle vor.

In Tabelle 7 sind sowohl Zahl, als auch Typ der Aberrationen pro Tier dargestellt. Metaphasen mit

mehreren Aberrationen wurden immer nur einer Gruppe beigeordnet, und zwar der mit dem schwerwiegendsten Aberrationstyp. Multiple Aberrationen sind ebenfalls nach dem höchsten Aberrationstyp klassifiziert.

Die nachfolgenden Abbildungen 12, 13, 14, 15 und 16 zeigen Beispiele aberranter Metaphasen, wie sie im Versuch gefunden wurden.

In Abbildung 12 sind klassische Beispiele für Aberrationen an Chromatiden und Chromosomen, ihrer Schwere nach geordnet, aufgeführt.

Tabelle 7: Aberrationstypen pro untersuchtes Versuchstier

Tier-Nr.	aberrante Metaphasen incl. Gaps	aberrante Metaphasen excl. Gaps	Pulverisat. u. Fragmenten- tationen	Brüche u. Fragmenten	Reunionsfiguren				multiple Aber- rationen		
					D'D''	I	I'/I''	B u. F	D	I'/I''	
1 54	28		2	11	2	0	9	2	0	2	
2 57	45		7	9	4	0	12	1	1	11	
3 58	45		8	7	0	3	12	4	0	11	
4 46	29		1	9	1	1	9	2	2	4	
5 61	52		18	12	1	1	11	3	2	4	
6 66	55		9	13	4	1	18	1	2	7	
342/28,5 %	254/21,2 %	45/3,8 %	61/5,1 %	12/1 %	6/ 0,5 %	71/5,9 %	13/ 1,1 %	7/ 0,6 %	39/ 3,3 %		

Abb. 12: Beispiele für Aberrationsfiguren

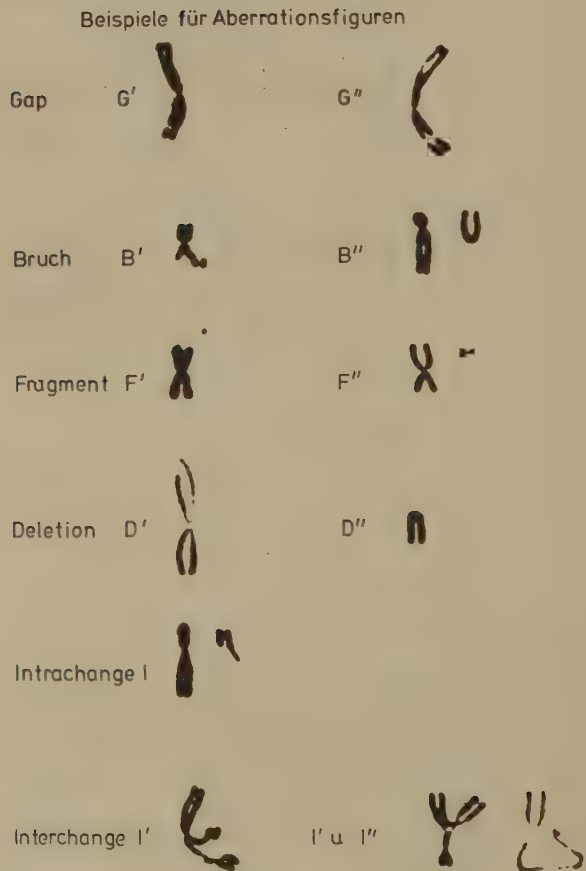


Abb. 13: Multiple Aberrationen

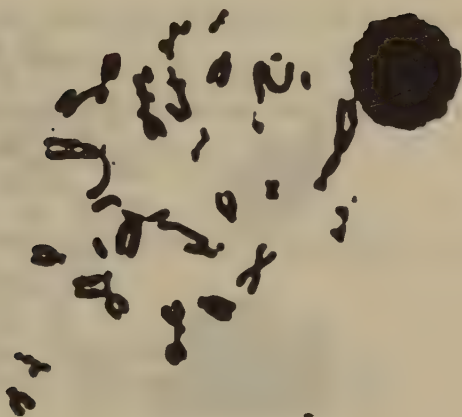


Abb. 14: Multiple Aberrationen

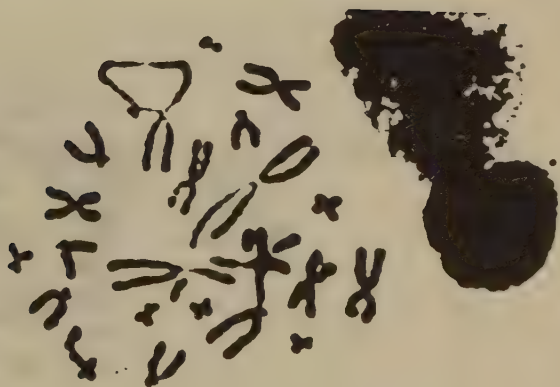


Abb. 15: Fragmentierte Metaphase

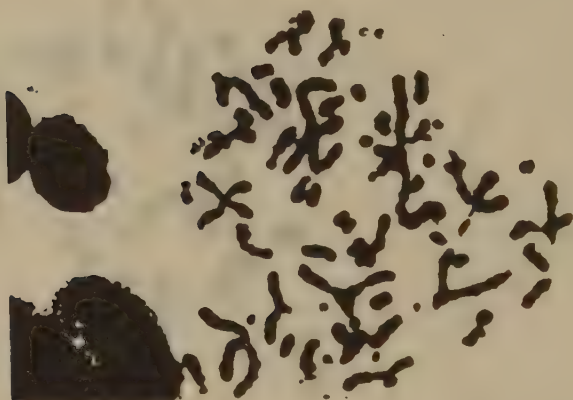


Abb. 16: Pulverisierte Metaphase



II Chromosomenanalyse der Spermatogonien

Von den 5 Kontrolltieren wurden je 100 Metaphasen ausgewertet. Inclusive Gaps waren 12 Metaphasen, d. h. 2,4 % aberrant und exclusive Gaps 2 Zellen, also 0,4 % aberrant (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Gesamtzahl aberranter Metaphasen in der Kontrolle

untersuchte Metaphasen	aberrante Metaphasen incl. Gaps		aberrante Metaphasen excl. Gaps	
	n	%	n	%
500	12	2,4	2	0,4

Tabelle 9 zeigt außer zwei Metaphasen mit Brüchen keine strukturellen Aberrationen in der Kontrolle.

Tabelle 9: Aberrationstypen pro untersuchtes Kontrolltier

Tier Nr.	untersuchte Meta- phasen	aberrante Meta- phasen incl. Gaps	aberrante Meta- phasen excl. Gaps	Brüche	Fragmente
1	100	2	0	0	0
2	100	4	2	2	0
3	100	2	0	0	0
4	100	3	0	0	0
5	100	1	0	0	0
ge- samt	500	12	2	2	0

Im Versuch waren von den 500 ausgewerteten Zellen inclusive Gaps 17, d. h. 3,4 % aberrant und exclusive Gaps lagen 3 Metaphasen mit strukturellen Defekten vor, das sind 0,6 % (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Gesamtzahl aberranter Metaphasen

untersuchte Metaphasen	aberrante Metaphasen incl. Gaps		aberrante Metaphasen excl. Gaps	
	n	%	n	%
500	17	3,4	3	0,6

Die Verteilung in Tabelle 11 macht deutlich, daß außer einer Metaphase mit einem Interchange und zwei Brüchen auch im Versuch nur achromatische Lücken gefunden wurden. Der χ^2 Test mit einem P-Wert von 0,4 gegenüber der Kontrolle besagt, daß hier keine signifikante Erhöhung der Aberrationsrate festzustellen ist.

Auf die Ursache wird im Rahmen der Diskussion noch einzugehen sein.

Tabelle 11: Aberrationstypen pro untersuchtes Versuchstier

Tier Nr.	untersuchte Metaphasen	aberrante Metaphasen incl. Gaps	abberante Metaphasen excl. Gaps	Brüche	Interchanges
1	100	2	1	1	0
2	100	2	1	1	0
3	100	2	1	0	1
4	100	5	0	0	0
5	100	6	0	0	0
gesamt	500	17/3,4 %	3/0,6 %	2/0,4 %	1/0,2 %

III Auswertung Mikrokerntest

Von den drei männlichen und drei weiblichen Kontrolltieren wurden jeweils 1 000 polychromatische und 1 000 normochromatische Zellen ausgezählt. Unter den 6 000 polychromatischen Erythrozyten fanden sich 27, d. h. 4,5 % mit Mikrokernen und unter den 6 000 normochromatischen Erythrozyten 13, d. h. 2,2 %.

Tabelle 12: Gesamtzahlen mikrokernhaltiger Zellen
in der Kontrolle

Tier Nr.	poly- chroma- tische Zellen	Mirkonuklei in polychro- matischen Zellen	normo- chroma- tische Zellen	Mikronuklei in normochro- matischen Zellen
1-3	3 000	13	3 000	9
4-6	3 000	14	3 000	4
ge- samt	6 000	27 4,5 ‰	6 000	13 2,2 ‰

Auf 6 000 normochromatische wurden 3 947 polychroma-
tische Zellen gezählt, das bedeutet ein Verhältnis
von 1 : 0,657.

Im Versuch enthielten 124 von 6 000 polychromatischen
Zellen Mikrokerne. Die 6 000 normochromatischen Zel-
len wiesen 31 mit Mikrokernen auf. Das Ergebnis des
Versuchs ist in Tabelle 13 für jedes Tier dargestellt.

Für die mikrokernhaltigen polychromatischen Zellen
wurde ein P-Wert ermittelt, der kleiner als 10^{-10}
ist. Somit ist das Ergebnis des Versuchs stark signi-
fikant.

Die mikrokernhaltigen normochromatischen Erythrozyten
waren gegenüber der Kontrolle weniger, aber mit einem
P-Wert kleiner 0,01, immer noch schwach signifikant.

Bei 6000 gezählten normochromatischen Zellen erreichten die polychromatischen 5 212, das entspricht einem Verhältnis von 1 : 0,87.

Tabelle 13: Mikrokernhaltige Zellen pro Tier im Versuch

Tier Nr.	polychro- matische Zellen	Mikrokern- e in poly- chromati- sche Zel- len	normochro- matische Zellen	Mikrokern- e in normo- chromatischen Zellen
1	1 000	22	1 000	4
2	1 000	19	1 000	7
3	1 000	21	1 000	4
4	1 000	20	1 000	7
5	1 000	21	1 000	6
6	1 000	21	1 000	3
ge- samt	6 000	124/20,6 %	6 000	31/ 5,2 %

In den nachfolgenden Abbildungen 17, 18 und 19 sind Mikrokern-
e in kernlosen Zellen, d. h. in poly- und normochromatischen Erythrozyten, sowie in einer kernhaltigen Zelle dargestellt.

Abb. 17: Mikrokern in polychromatischen Erythrozyten

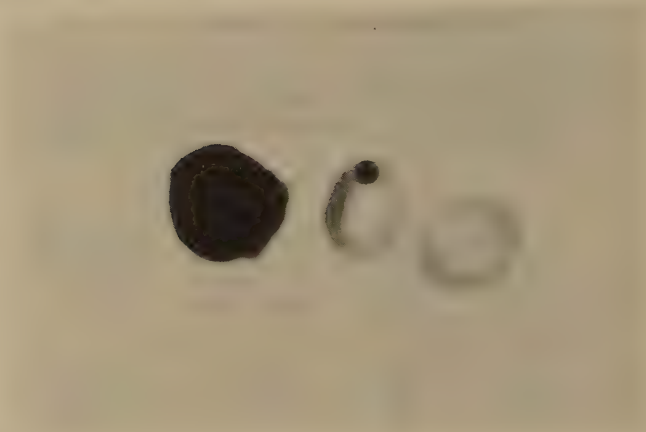


Abb. 18: Mikrokern in normochromatischem Erythrozyten

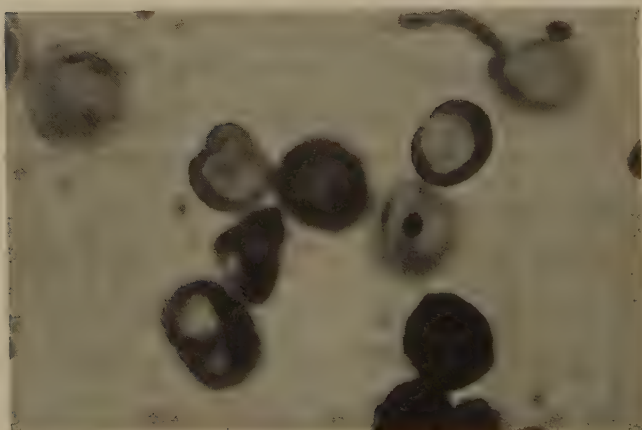
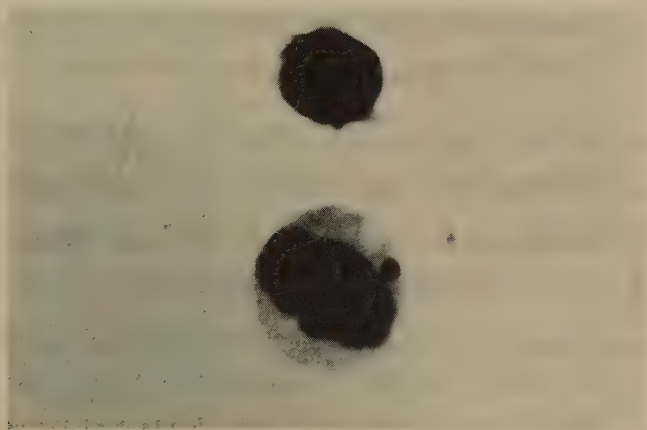


Abb. 19: Mikrokern in kernhaltiger Blutzelle



D Diskussion

Im Hinblick auf die mutagene Wirkung ist Cyclophosphamid eines der meist untersuchten Pharmaka, die in der Therapie maligner Tumoren eingesetzt werden.

Röhrborn (1965, 1966) erzielte erstmals positive Ergebnisse bei Untersuchungen an *Drosophila melanogaster*.

Im dominanten Letaltest mit der Maus konnte Brittinger (1966) mutagene Effekte nachweisen. Hier wurden 9 1/2 - 12 1/2 Wochen alte männliche C 3 H Mäuse 14 - 17 Stunden vor der Paarung mit 8 Wochen alten virginen Mäusen mit verschiedenen Dosen von Cyclophosphamid (210 - 420 mg/kg) einmal ip. behandelt. 15 Tage post conceptionem wurde der Uterus der Weibchen untersucht. Eine Dosis von 210 mg/kg hatte weniger Befruchtungen als in der Kontrollgruppe zur Folge und führte zu einem vermehrten prä- und postimplantiven Eiverlust, d. h. sie induzierte dominante Letalmutationen

Siebert setzte Hefen als Indikatoren dem Urin Endoxan-behandelter Ratten und Menschen aus. Eine 100fache Steigerung der Mutationsrate gegenüber der Kontrolle zeigten die Zellen bei der Kontamination mit Rattenurin (Siebert 1973).

Auch an Lymphozytenkulturen erhielten Schmid und

Bauchinger (1973) positive Befunde in Form von Chromatidenbrüchen und lokalen Achromasien.

Stegner untersuchte 1974 die Mutagenität von Cyclophosphamid am Knochenmark des chin. Hamsters und kam ebenfalls zu positiven Befunden.

Nach diesen eindeutigen Ergebnissen, die zeigen, daß Cyclophosphamid in fast allen Prüfverfahren positiv reagiert, erschien der Stoff als geeignete Testsubstanz im Rahmen unserer Problemstellung.

Bei der zytogenetischen Analyse des Knochenmarks zeigte sich:

1. Die Zahl der Spontanaberrationen in der Kontrolle entspricht mit 2,7 % incl. Gaps ungefähr den bei anderen Autoren angegebenen Werten (Röhrborn, Buckel 1976).
2. Das Resultat des Versuchs liegt bei der von uns gewählten Applikationsart und Dauer bei 28,2 % aberrante Metaphasen incl. Gaps.

Bei der Aufteilung in Aberrationstypen ergibt sich folgendes Bild. Den größten Anteil an den strukturellen Aberrationen exclusive Gaps haben mit 11,2 % die Reunionsfiguren, es folgen die Brüche und Fragmente mit 6,2 %, die multiplen Aberrationen mit 4,9 % und die Pulverisationen mit 3,8 %.

Abbildung 20 zeigt eine Einteilung der aberranten Metaphasen nach dem Schweregrad des Aberrationstyps. Die multiplen Aberrationen nehmen hier den 1. Rang ein. Die Pulverisationen bilden das Ende der Säule, da sie so starke Schädigungen darstellen, daß diese Zellen mit Sicherheit untergehen. In Abbildung 21 wurde auf eine gesonderte Darstellung der multiplen Aberrationen verzichtet und die jeweils schwersten Aberrationen in dieser Gruppe den noch verbleibenden Aberrationstypen zugeordnet.

Abb. 20: Darstellung mit multiplen Aberrationen

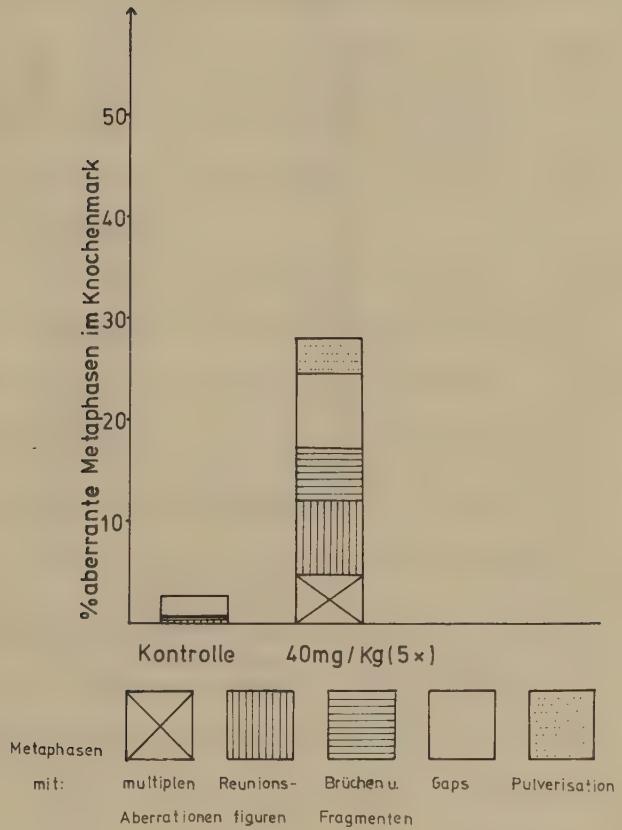
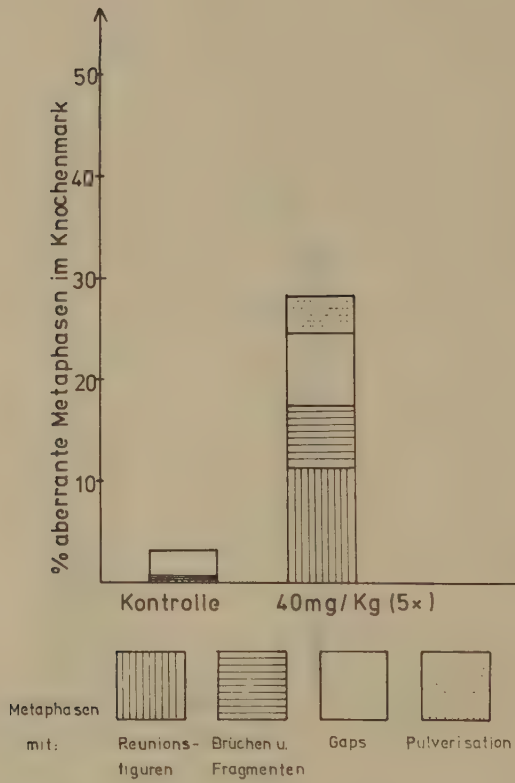


Abb. 21: Darstellung ohne multiple Aberrationen



Vergleicht man die zweimalige ip. Applikation von 40 mg/kg Cyclophosphamid (Mohr 1978) mit der 5maligen, so zeigt sich: Mit 32,8 % inklusive Gaps lag sein Ergebnis geringfügig höher. Es wird aber nach Einbeziehung seiner relativ hohen Kontrollwerte etwas nivelliert. Während das auch für den Prozentsatz der Reunionsfiguren und Brüche zutrifft, liegt doch ein Unterschied bei der Zahl der Pulverisationen. Bei 2facher Applikation beträgt sie 0,8 % und bei 5facher Applikation 3,8 %.

Schmid und Arakaki (1971) konnten nach 5maliger oraler Verabreichung von 64 mg/kg Körpergewicht sogar eine Senkung der aberranten Metaphasen gegenüber einer 2maligen Applikation vermerken. Die Erklärung für dieses Testergebnis liegt aber daran, daß nach 5maliger Verabreichung (oral) im Abstand von 24 Stunden die Mucosazellen des Darmtraktes so stark geschädigt werden, daß eine einwandfreie Resorption des Wirkstoffes nicht mehr gewährleistet ist. Erst als man das Applikationsintervall vergrößerte, wurde eine leichte Erhöhung der aberranten Metaphasen sichtbar, die sich auch in der Zahl der Pulverisationen verdeutlichte.

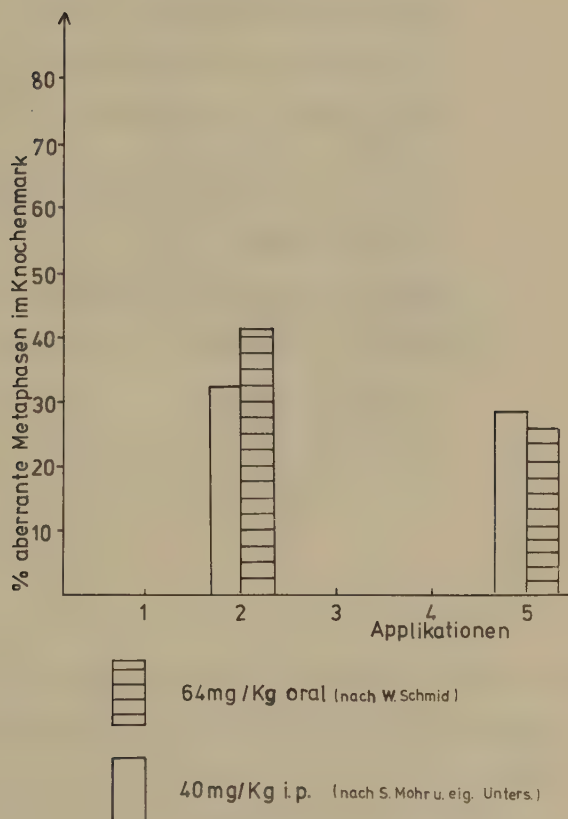
Untersuchungen von Schmid nach mehrmaliger ip. Injektion brachten keine nennenswerte Erhöhung der Zahl aberranter Metaphasen.

Das vermehrte Auftreten der Pulverisation ist sicherlich als Zeichen einer erhöhten Dosis infolge mehrmaliger Verabreichung zu werten. Es sollte jedoch nicht gesondert betrachtet werden, da Zellen dieses Aberrationstyps untergehen und nicht mehr mitotisch aktiv sind.

Das Ergebnis unserer Knochenmarksuntersuchungen am chin. Hamster verglichen mit denen von Mohr und Schmid zeigt, daß für die Zahl und Art der aberranten Metaphasen in erster Linie die Höhe der Einzeldosis und die Wahl der Aufarbeitungszeit nach der wiederholten Verabreichung entscheidend ist und nicht die Dauer der Behandlung. Alle Autoren bestätigen, daß mit der Zunahme des Intervalls zwischen der letzten Applikation und der Tötung des Tieres, besonders über 12 Stunden hinaus, die Zahl der aberranten Zellen deutlich abnimmt.

Die Abbildung 22 zeigt im Vergleich die 2fache und 5fache Applikation, sowohl oral, wie auch ip. appliziert. Hieraus geht noch einmal deutlich hervor, daß die 2fache Applikation die optimale Methode ist, solange es sich um einen Stoff handelt, der relativ schnell metabolisiert wird und nicht in irgendeinem Körperorgan kumuliert wird.

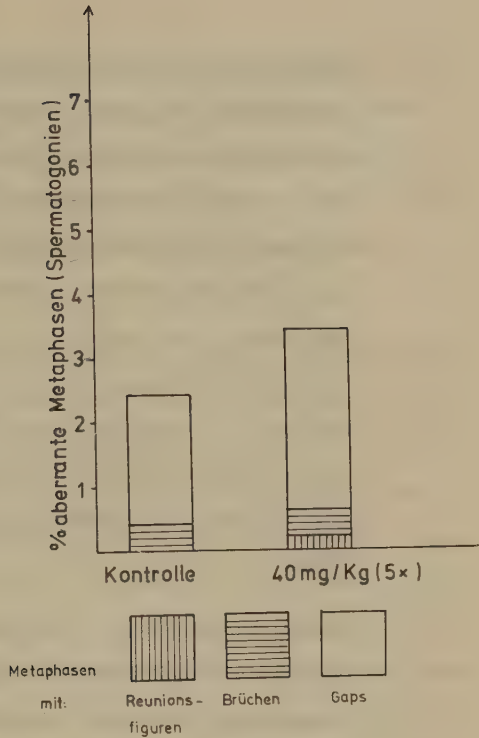
Abb. 22: Vergleich: 2fache und 5fache Applikation,
oral und ip.



Die Spermatogonienpräparate blieben bezüglich der Ausbeute an Metaphasen deutlich hinter der der Knochenmarkspräparate zurück. Schließlich wurde die Zahl der auswertbaren Metaphasen noch durch präparationstechnisch bedingte Faktoren, wie Überlagerungen von Chromosomen und Ähnlichem verringert. Im Schnitt fanden sich auf jedem Präparat 20 - 30 auswertbare Metaphasen, gegenüber ca. 100 im Knochenmarkstest. Dies zeigt, daß der Spermatogonientest wesentlich arbeitsaufwendiger ist.

Das Ergebnis der zytogenetischen Analyse der Spermatogonien ist in Abb. 23 dargestellt.

Abb. 23:



Es zeigt sich, daß zwar eine schwache Steigerung der aberranten Zellen um ca. 1 % im Versuch vorliegt, jedoch liegt diese Zahl bei 500 untersuchten Metaphasen nicht signifikant höher als die Kontrollwerte.

Diese Untersuchungen korrelieren mit denen von Müller et al. (1972). Sie stellten am Keimepithel des chin. Hamsters nach 1maliger Gabe von 256 mg/kg und ver-

schiedenen Aufarbeitungszeiten keine signifikante Erhöhung chromosomaler Aberrationen an Metaphasen I und II der Meiose als Folge einer Schädigung prämeiotischer Entwicklungsstadien fest. Die von den o. g. Autoren ebenfalls durchgeführte Analyse des Knochenmarkes erbrachte Werte, die mit den unsrigen vergleichbar sind. Eine Arbeit von Tates und Natarajan (1976), in der CNU-aethanol (2-chloräthyl-1-nitrosoureido-äthanol) in verschiedenen Dosen von Mäusen getestet wurde, zeigt ebenfalls eine bedeutend stärkere Sensibilität des Knochenmarkes gegenüber der der Spermatogonien.

Lorke und Machemer (1976) testeten die Wirkung von Cyclophosphamid auf die spermatogonialen mitotischen Metaphasen des chin. Hamsters und ermittelten folgende Resultate.

Bei einer 2maligen Applikation von 32 mg/kg p. o. und einer Aufarbeitungszeit von 24 Stunden ergab sich keine signifikante Erhöhung der aberranten Metaphasen. Erst eine Verlängerung des Intervalls bis zur Tötung um nochmal 24 Stunden brachte eine Steigerung der Zahl aberranter Zellen, die sich statistisch absichern ließ. Auch eine 5fache Applikation von 250 mg/kg p. o. nach einer 24 Stunden Präparation ließ den Prozentsatz der aberranten Metaphasen incl. Gaps von 2,5 %

in der Kontrolle auf 9,4 % im Versuch steigen. Machemer fand auch bei einer therapeutischen Dosis von 8 mg/kg und einer Aufarbeitungszeit von 48 Stunden eine schwach signifikante Erhöhung der Aberrationen, konnte aber dieses Ergebnis bei einer Verdoppelung der Dosis nicht bestätigen.

Diskutiert man das Resultat unserer Untersuchungen mit dem von Machemer und Lorke, so drängt sich der Schluß auf, die Aufarbeitungszeit, d. h. das applikationsfreie Intervall bis zur Tötung von 12 auf 48 Stunden zu verlängern, um so eine höhere Zahl von Mitosen bzw. S und G2 Phasen unter dem Einfluß des Wirkstoffes ablaufen zu lassen. Bei 5maliger Applikation mit extrem hohen Dosen scheint ein Aufarbeitungsintervall von 24 Stunden auszureichen, da so in jedem Falle mehrere Zellzyklen getroffen werden.

Im direkten Vergleich der Befunde beider Tests, Knochenmark - stark erhöhte Aberrationsrate - Spermato gonien - kaum erhöhte Aberrationsrate -, muß man, was die Beurteilung der Spermato gonienmethode betrifft, folgende Faktoren und Erwägungen berücksichtigen.

1. Die mitotische Aktivität der Keimzellen ist offenbar geringer als die des Knochenmarks. Wir schließen dies aus der hohen Anzahl der Metaphasen in den

Kontrollpräparaten des Knochenmarkes und der relativ geringen Zahl von mitotisch aktiven Zellen in der Spermatogonienkontrolle.

So fanden sich in der Spermatogonienkontrolle pro Präparat nur ca. 20 - 30 auswertbare Metaphasen, während die Knochenmarkpräparate in der Kontrolle ca. 100 auswertbare Metaphasen ergaben.

2. Inwieweit das Ergebnis der Spermatogonienanalyse durch die Tatsache beeinflußt wird, daß die Hoden im Gegensatz zum Knochenmark ungünstiger durchblutet werden, ist nicht geklärt.
3. Nach Brittinger (1966) ist die postmeiotische Reifungsphase der männlichen Keimzellen der Maus gegenüber dem mutagenen Effekt von Endoxan^R sensibler als die prämeiotische Phase. Auch Vogel und Röhrborn (1967) bestätigen dieses Ergebnis an Hand dominanter Letalmutationen bei der Maus.
Da sich unsere Untersuchung ausschließlich auf die Spermatogonien bezog, könnte man hier unter anderem einen Grund für die niedrige Aberrationsrate sehen.
4. Schleiermacher et al. (1967) applizierten männlichen Mäusen 210 mg/kg Endoxan ip. Es kam zu einem Verlust an Spermatogonien und Spermatozyten, d. h. im weiteren Verlauf zu einem Fehlen der Spermatiden

und zu einer Veränderung einzelner Tubulusabschnitte, in denen schließlich nur noch Sertolizellen und einige A-Spermatogonien erhalten blieben. Die Regeneration trat erst einige Zeit später ein.

Fermenthistochemische Untersuchungen von Jungk (1967) an Ratten ergaben nach einer 5maligen Applikation von 35 mg/kg zwar ausgefüllte Hoden-Tubuli, aber eine deutliche Minderung der Succinodehydrogenase und der Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase der Leydigzellen und in geringerem Maße eine Minderung der NAD-Zytochrom-C-Reduktase, Laktatdehydrogenase und Steroid 3- β ol -Dehydrogenase in Tubuli und Interstitium.

Aus diesen Befunden wird ersichtlich, daß Cyclophosphamid außer einem möglichen mutagenen Effekt auf die Keimzellen sicherlich auch einen toxischen Effekt auf das Hodengewebe hat. Möglicherweise spielt diese Tatsache eine gewichtige Rolle für unseren negativen Befund und die geringe Zahl der Mitosen überhaupt.

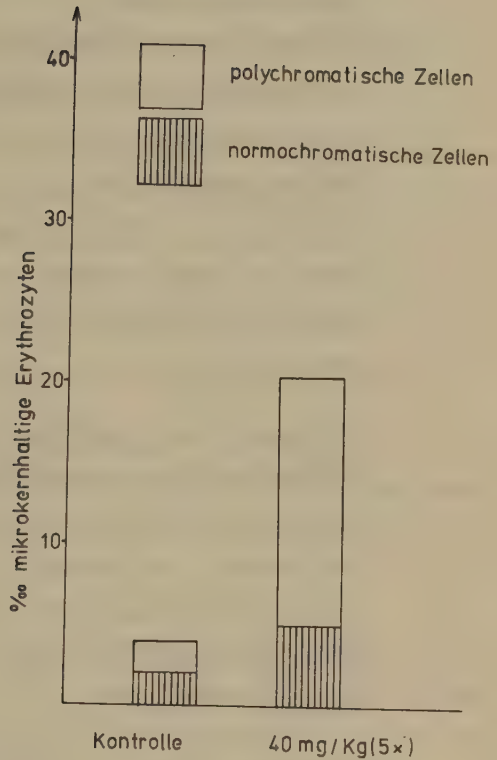
Abschließend läßt sich zur Diskussion der Spermatogonienmethode feststellen, daß die Stadienspezifität für die Wirkung einer mutagenen Substanz zu wenig geklärt ist. Ein negativer Befund bei der Analyse spermatogonialer Metaphasen nach Applikation einer Test-

substanz berechtigt nicht zu dem Schluß, daß diese Substanz keinen mutagenen Effekt auf gonosomale Zellen hat. Im Gegenteil, hier können Depression der mitotischen Aktivität und Selektion der chromosomal geschädigten primordialen Zellen für die Verschleierung eines etwaigen positiven Befundes verantwortlich sein. Auch kann die Dosis zu niedrig gewählt sein, so daß ein mutagener Effekt überhaupt nicht eintritt.

In guter Korrelation zu Ergebnissen der Knochenmarkanalyse stehen die Befunde im Mikrokerntest. In Abbildung 24 ist die Zahl der mikrokernhaltigen polychromatischen und die der normochromatischen Zelle des Versuchs gegenüber der Kontrolle aufgetragen. Mit 20,6 % mikrokernhaltigen polychromatischen Erythrozyten war die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 10^{-10} . Die Zahl der mikrokernhaltigen normochromatischen Zellen stieg von 2,2 % in der Kontrolle auf 5,2 % im Versuch.

Mohr (1978) fand nach 2maliger Applikation von 40 mg/kg bezüglich der polychromatischen Zellen mit Mikrokernen ein ähnliches Resultat. Jedoch konnte er eine signifikante Erhöhung mikrokernhaltiger normochromatischer Erythrozyten nicht nachweisen.

Abb. 24:



Eine Verschiebung des Verhältnisses polychromatischen zu normochromatischen Zellen zugunsten der Normochromatischen, wie Mohr nach 2facher Applikation feststellte, traf für unseren Versuch nicht zu. Im Gegenteil, nach 5facher Applikation änderte sich das Verhältnis von polychromatischen zu normochroma-

tischen Zellen von 0,657 : 1 auf 0,87 : 1. Diese Tatsache könnte als kompensatorische Zunahme der Erythropoese infolge subakuter Behandlung gewertet werden. Das Ergebnis steht in gewissem Einklang mit Untersuchungen von Boller und Schmid (1970) und Kaboth et al. (1968), die nach 11 Injektionen (täglich) von 15 mg/kg Endoxan am Knochenmark des Meer-schweinchens ebenfalls eine Vermehrung der Erythropoese feststellten.

Eine signifikante Erhöhung, wenn auch gering, der mikrokernhaltigen normochromatischen Erythrozyten war durchaus erwartet, da die polychromatischen Zellen nach etwa 24 - 30 Stunden in die reife Form übergehen, und eine Ausschleusung der mikrokernhaltigen Zellen in das periphere Blut zögernd vonstatten geht (Von Ledebur und Schmid 1973).

Es bleibt zu erwarten, ob bei chronischer Applikationsweise die Zahl der mikrokernhaltigen roten Blutkörperchen durch die Erythrozytenmauserung der Milz weiter niedrig gehalten wird. Ein weiterer Grund dafür, daß die Zahl der mikrokernhaltigen reifen Zellen relativ gering bleibt, könnte die Tatsache sein, daß mit der Kleinkernbildung stets eine Funktionsstörung des Hauptkerns einhergeht. Diese kann schließlich dazu führen, daß die Zelle der Zellselektion zum Opfer

fällt, und das bedeutet für unseren Fall, daß eine Reifung vom polychromatischen zum normochromatischen Erythrozyten erst gar nicht eintritt (Rieger und Michaelis 1967).

Die oben erwähnte gute Übereinstimmung der Ergebnisse von Knochenmarksanalyse und Mikrokerntest, läßt den Mikrokerntest als Paralleltest geeignet erscheinen. In diesem Falle könnten von demselben Tier die Präparate für beide Testverfahren hergestellt werden.

Das setzt natürlich voraus, daß Colcemide keine zusätzlichen Aberrationen verursacht. Aus diesem Grunde verglichen wir die Kontrolle unserer Arbeit mit der von Mohr (1978).

Diese lag mit 3 % mikrokernhaltigen normochromatischen Erythrozyten und 2,3 % mikrokernhaltigen polychromatischen Erythrozyten sogar niedriger als in den hier vorliegenden Untersuchungen.

Daraus folgt, daß Colcemide keine Mikronuklei verursacht; mit einer co-mutagenen Wirkung ist also nicht zu rechnen.

Sicherlich ist auch die Dauer der Einwirkung des Spindelfasergiftes, 2 Stunden bis zur Aufarbeitung, zu kurz, um Mikrokerne auszulösen. Dann nämlich müßte Colcemide in dieser Zeit chromosomenbrechende Wirkung

zeigen, die sich in der darauffolgenden Mitose durch Mikrokernbildung manifestieren würde.

Da aber für die Entstehung der Mikrokerne eine abgelaufene Telophase mit Kernmembranbildung Voraussetzung ist, und die Gesamtdauer einer Mitose einschließlich Telophase 1 - 2 Stunden beträgt, wäre der Angriffspunkt für eine Kleinkernbildung unter dem Einfluß von Colcemide innerhalb der Mitose zu suchen.

Nach den bisherigen Erkenntnissen liegt dieser zwar in der Mitose, jedoch gilt es als sicher, daß Spindelfasergifte die Mitose in der zweiten Hälfte der Metaphase hemmen, indem sie sich mit den Proteinen der Mikrotubuli der Spindelfasern verbinden und diese zerbrechen (Müller 1975). Ein Auseinanderweichen der Chromatidhälften der Chromosomen wird also verhindert und eine Telophase tritt gar nicht erst ein. So kommt es in einem Zellverband mit hohem Anteil an proliferierenden Zellen nach Gabe von Mitosespindelgiften zu einer Anhäufung von arretierten Metaphasen. Dieser sogenannte stathmokinetiche Effekt ist meist irreversibel. Unter diesen Voraussetzungen ist es also nicht denkbar, daß Colcemide Mikrokerne induziert, sondern es ist eher mit einer Absenkung der Mikrokernrate zu rechnen, die aber zu einer relativ erniedrigten Gesamtzahl von Erythrozyten zu sehen ist, so daß

das Ergebnis durch diese Tatsache, wenn sie überhaupt relevant ist, nicht beeinflußt werden dürfte.

Insgesamt betrachtet muß man den Mikrokerntest, was die Prüfung chromosomenbrechender Agenzien betrifft, in die Reihe der zu wählenden Testmethoden einordnen. Er imponiert durch seine simple Methode und allgemeine Aussagekraft; außerdem steht er in ungewöhnlich guter Relation zur chromosomalen Analyse des Knochenmarks, insbesondere was die Dosis-Effekt Kurve betrifft (Mohr 1978, Weber 1975).

Er läßt jedoch keine Schlüsse auf den Schweregrad und die Häufigkeit bestimmter Aberrationen zu und ist somit bei genauerer Untersuchung zweckmäßigerweise durch eine zytogenetische Analyse des Knochenmarks zu ergänzen.

E Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden vergleichend drei zytogenetische Testverfahren zur Prüfung von Chemikalien auf Mutagenität am chinesischen Hamster angewandt.

Hierbei handelt es sich um die zytogenetische Analyse von Chromosomen des Knochenmarks, die zytogenetische Analyse der Spermatogonien und um den Mikrokerntest.

Die Prüfsubstanz Cyclophosphamid wurde in allen Versuchserien fünfmal im Abstand von 24 Stunden ip. appliziert. Die Einzeldosis betrug 40 mg/kg Körpergewicht. 12 Stunden nach der letzten Applikation wurden die Hamster getötet und aufgearbeitet.

Die Aberrationsrate im Knochenmark war mit 28,5 % incl. Gaps signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht, wobei die Reunionsfiguren zu den häufigsten Aberrationen zählten. Gegenüber nur 2 Applikationen der gleichen Dosis (Mohr 1978) war lediglich die Zahl der Pulverisationen erhöht.

Mit diesen zytogenetischen Befunden korrelieren die Ergebnisse des Mikrokerntests. Im Mikrokerntest stieg die Zahl der polychromatischen Erythrozyten mit Mikrokernen von 27 in der Kontrolle auf 124 im Versuch, be-

zogen auf jeweils 6 000 untersuchte Zellen. Gegenüber einer 2maligen Applikation (Mohr 1978) wurde bei 5maliger Applikation eine signifikante Erhöhung der mikrokernhaltigen normochromatischen Zellen ermittelt.

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Befunden stehen die Untersuchungen der spermatogonialen Metaphasen.

Die Aberrationsrate in den Versuchserien war nur schwach gegenüber den Kontrollen erhöht.

Die unterschiedlichen Befunde wurden diskutiert.

F Literaturverzeichnis

- Alarcon R. A. und
Meienhofer J.: Bildung des zytotoxischen
Adehyds
Acrolein beim Endoxan-Abbau
in vitro.
Nature New Biology 233,
250 - 252 (1971)
- d'Ambrosio F.,
Fontana-Donatelli G.,
Malagoli F.: Einfluß der zytostatischen Be-
handlung mit Cyclophosphamid
auf Faktoren der Blutgerinnung
bei Patienten mit Neoplasien
des Genitalapparates.
Annali di Ostetricia e Gine-
cologie 84,
1 965 - 1 080 (1962)
- Arnold H.: Über den hydrolytischen Abbau
des Zytostatikums Endoxan unter
physiologischen Bedingungen.
2. Internationales Symposium
für Chemotherapie, Neapel
III,
79 - 80 (1963)
- Arnold H,
Bourseaux F.,
Brock N.: Neuartige Krebs-Chemotherapeu-
tika aus der Gruppe der zykli-
schen N-Lost-Phosphamidester
Naturwiss. 45,
64 - 66 (1958)
- Über Beziehungen zwischen che-
mischer Konstitution und kan-
zerotoxischer Wirkung in der
Reihe der Phosphamidester des
Bis-(β -chloräthyl)-amins
Arzneim. Forsch. 11,
143 - 158 (1961)
- Arnold H,
Klose H.: Über den hydrolytischen Abbau
des hexazyklischen N-Lost
phosphamidesters Endoxan unter
physiologischen Bedingungen.
Arzneim. Forsch. 11,
159 - 163 (1961)

- Auerbach C.,
Robson J. M.: Production of mutations by
mustard oil allyl isothiocyanate.
Nature 81,
154 (1944)
- Bagley Ch. M.,
Bostik Fr. W.,
DeVita V. T.: Klinische Pharmakologie von
Cyclophosphamid.
Cancer Res. 33,
226 - 233 (1973)
- Basler A.,
Herbold B.: Mutagenese und Umwelteinflüsse.
Hippokrates 47,
123 - 141 (1976)
- Bautz E.,
Freese E.: On the mutagenic effect of
alkylating agents.
Proc. Nat. Acad. Sci. Us 47,
1 585 - 1 594 (1960)
- Benjamin H.: Endoxan bei der Behandlung
maligner Erkrankung, ein
überarbeitetes Dosierungsschema.
Med. Proc. Südafrika 9,
412 - 414 (1963)
- Bianchi V.,
Gallo G.: Erste Ergebnisse der Behandlung
des chron. Gelenkrheumatismus mit Cyclophosphamid.
Gazz. Ing. Med. Chir. 67,
680 (1962)
- Biraben J.,
Delmon G.: Experimentelle Studie über
die Wirkung hoher Dosen von
Cyclophosphamid bei der Ratten- und Guerin-Karzinom T 8
Bull. Soc. Phar. Bourdeaux
102,
119 - 124 (1963)

- Boeckl O.,
Heitz H.,
Karrer K.,
Mannheimer E.:
Über die Möglichkeit der
Therapie bösartiger Tu-
moren mit hochdosierten
Zytostatika.
Arzneim. Forsch. 14,
797 - 801 (1964)
- Boller K.,
Schmid W.:
Chemische Mutagenese beim
Säuger.
Humangenetik 11,
35 - 54 (1970)
- Bouroncle B. A.,
Datta P.,
Frajola W. J.:
Makroglobulinämie Waldenström
Bericht über 3 mit Cyclophos-
phamid behandelte Patienten.
I. Amer. Med Ass. 189,
729 - 732 (1964)
- Brock N.:
Zur pharmakologischen Chrak-
terisierung zyklischer N-
Lost Phosphamidester als
Krebs Therapeutika.
Arzneim. Forsch. 8,
1 - 9 (1958)
- Pharmakologische Grundlagen
der Chemotherapie maligner
Tumoren
Boll. Soc. Med. Chir. Cremona
16,
565 - 588 (1962)
- Entwicklung und pharmakologi-
sche Charakterisierung von
Transport- Wirkform-Substan-
zen für selektive Chemo-
therapie des Krebses.
2. Internationales Symposium
für Chemotherapie Neapel
1961 III
1963 45 - 68
- Brock N.,
Hohorst H. J.:
Über die Aktivierung von
Cyclophosphamid in vitro
und in vivo.
Arzneim. Forsch. 13,
1 021 - 1 0 31 (1963)

- Brock N.,
Gross R.,
Hohorst H. J.: Aktivierung von Cyclophosphamid bei Mensch und Tier. Cancer 27, 1 512 - 1 529 (1971)
- Brittinger D.: Die mutagene Wirkung von Endoxan bei der Maus. Mumangenetik 3, 156 - 165 (1966)
- Druckrey H.,
Steinhoff D.,
Nakayama M.,
Preussman R.,
Anger K.: Experimentelle Beiträge zum Dosis-Problem in der Krebschemotherapie und zur Wirkungsweise von Endoxan. Dtsch. Med. Wschr. 88, 651 - 653 715 - 721 (1963)
- Duncan J. H.,
Colvin D. M.,
Fenselau C.: Massenspektrometrische Untersuchungen der Verteilung von Cyclophosphamid beim Menschen. Toxicol. Pharmacol. 24, 317 - 323 (1973)
- Engelhardt G.: Vergleichende Untersuchungen zur Sensibilität von Knochenmark, Lymphozyten und Spermatogonien des chin. Hamsters gegenüber Butyl-Nitroso-Harnstoff Dissertation Ruprecht-Karl Universität Heidelberg (1975)
- Gabridge M. G.,
Legator M. S.: A host-mediated microbial assay for the detection of mutagenic compounds. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 130 831 - 834 (1969)
- Gebhart E.: Experimentelle Beiträge zum Problem der lokalen Achromasien (Gaps) Humangenetik 13, 98 - 107 (1971)

- Goldeck H.: Beurteilung und Behandlung von Nebenwirkungen zytistischer Therapie. Regensb. Arztl. Fortb. 8, 288 - 292 (1965)
- Gross R.: Lehrbuch der Inneren Medizin FK Schattauer Verlag 5 Aufl. 1 147 - 1 157 (1977)
- Hohorst H. J.,
Ziemann A.,
Brock N.: 4 -Ketocyclophosphamid ein Metabolit des Cyclophosphamids Arzneim. Forsch. 21, 1 254 - 1 257 (1971)
- Hsu T. C.: Chromosomal evolution in cell populations. Int. Rev. Cytol. 12, 69 - 161 (1961)
- Iyer V. N.,
Szybalski W.: Two simple methods for the detection of chemical mutagens. Appl. Microbiol. 6, 23 - 29 (1958)
- Jungk E.: Histol. und enzymhistochemische Untersuchungen über die Wirkung einiger Zytostatika auf den reifen Rattenhoden. Acta. histochem. 28, 134 - 168 (1967)
- Kaboth W.,
Trepel F.,
Schick P.,
Werneke G.,
Begemann H.: Morphologische und funktionelle Veränderung im Blutzellsystem mit zytostatischen Substanzen und Prednisolon. II Veränderungen der Zellzusammensetzung sowie der DNS-, RNS und Proteinsynthese in blutbildenden Organen. Z. ges. exp. Med 306 - 336 (1968)

- Leblond C. P.,
Clermont Y.:
Spermatogenesis of Rat,
Mouse, Hamster and Guinea
Pig as revealed by the Peri-
odic-Acid-Fuchsin Sulfurous
Technique
The American Journal of
Anatomy,
Vol 90, No. 2 (1952)
- Definition of the stages of
the cycle of the seminiferous
epithelium in the rat.
Ann. N. Y. Acad. Sci. 55,
548 - 573 (1952 a)
- Leonhardt H.:
Histologie und Zytologie des
Menschen
Georg Thieme Verlag 1971
- Machemer L.,
Stenger E. G.:
Zur Reproduzierbarkeit der
Resultate mit Cyclophosphamid
und Trazichon im Dominanten-
letal-Test an der Maus.
Arzneim. Forsch. 21,
1 037 - 1 039 (1971)
- Machemer L.,
Lorke D.:
Method for Testing Mutagenic
Effekts of Chemicals on
Spermatogonia of the
Chinese Hamster.
Arzneim. Forsch. 25, 12
1 889 - 1 896 (1975)
- Meeus-Bith L.,
Clavel B.,
Gazeau J. N.,
Bourdin J. S.:
Anwendung von Cyclophosphamid
in massiven Dosen bei soli-
den menschlichen Tumoren.
Sem. Nop. Paris 44,
3 307 - 3 320 (1968)
- Mohr S.:
Über Empfindlichkeit und
Aussagekraft des Mikrokern-
testes im Vergleich zur
Chromosomenanalyse des
Knochenmarkes.
Dissertation Düsseldorf (1978)

- Müller D.,
Langauer M.,
Rathenberg R.,
Strasser E. F.,
Hess R.:
Mikrokerntest sowie Chromo-
somenuntersuchungen an soma-
tischen und gonosomalen Zel-
len des chin. Hamsters nach
Cyclophosphamidgabe.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 56,
381 - 384 (1972)
- Müller D.,
Deinhard K.-H.,
Deparade G.:
Untersuchungen über die
Kinetik der Spermatogenese
des chin. Hamsters.
Verh. Anat. Ges. 68,
93 - 97 (1974)
- Müller W. E. G.:
Chemotherapie von Tumoren
Biochemische Grundlagen
Verlag Chemie (1975)
- Oakberg E. F.:
A Description of Spermiogenesis
in the Mouse and its Use in
analysis of the cycle of the
seminiferous
Epithelium and Germcell renewal.
The American Journal of Anatomy
Vol 99,
391 - 414 (1956)
- Palme G.,
Liss E.,
Oeff K.,
Platis A.:
Der Einfluß von Cyclophosphamid
auf die Desoxyribonukleinsäure-
Synthese von normal prolife-
rierenden Zellen sowie Aszites-
Tumorzellen.
Arzneim. Forsch. 13,
1 034 - 1 039 (1963)
- Potel J.:
Die Beeinflussung immunologi-
scher Reaktionen durch kanzero-
toxische Substanzen.
Arzneim. Forsch. 15,
527 - 532 (1965)

- Potel J.,
Brock N.: Zur Pharmakologie der chemischen Immunosuppression.
Verh. Dtsch. Ges. Rheumatologie Bd. 2
Rheumaforsch. 31, Suppl. 2
339 - 357 (1972)
- Rieger R.,
Michaelis A.: Chromosomenmutationen
Genetik Beitrag 6
VEB Gustav Fischer Verlag
Jena (1967)
- Röhrborn G.: Chemische Konstitution und mutagene Wirkung.
Klassifizierungsversuch chemischer Mutagene
Experientia XVI-Fasc. 12,
523 - 529 (1960)
- Über die möglich mutagene Nebenwirkung von Arzneimitteln beim Menschen.
Humangenetik 1,
205 - 231 (1965)
- Über die mutagene Wirkung von Pharmaka unter bes. Berücksichtigung von Chloräthylamin-derivaten.
Habilitationsschrift Ruprecht-Karl Universität Heidelberg
(1965 b)
- Mutagenic N-Lost -Cyclophosphamides
Dros. Inf. Serv. 41,
102 (1966)
- Biochemical Mechanisms of Mutation
- The Activity of Alkylating Agents Sensitive Mutable Stages in Spermatogenesis and Oogenesis in Chemical Mutagenesis in Mammals and Man
Edited by F. Vogel and G. Röhrborn
Springer Verlag (1970)

- Röhrborn G.:
Methods for routine
mutagenicity Screening
in Mammals and Man.
In: Environmental Quality
and Safety
Vol 4
Georg Thieme 1975
- Röhrborn G.,
Buckel U.:
Investigations on the Frequency
of Chromosome Aberrations in
Bone Marrow Cell of Chinese
Hamsters after Simultaneous
Application of Caffeine and
Cyclophosphamide.
Humangenetik 33,
113 - 119 (1976)
- Ross W. C. J.:
The Chemistry of Cytotoxic
Alkylating Agents.
Advanc. Cancer Res. 1,
397 - 449 (1953)

In vitro Reactions of Bio-
logical Alkylating Agents.
Am. N. Y. Acad. Sci. 68,
669 - 681 (1958)

Biological Alkylating Agents.
London, Butterworths (1962)
- Savage J. R. K.:
Classification and Relationship
of induced Chromosomal Struc-
tural Changes.
Journal of Medical Genetics 12,
103 - 122 (1975)
- Scaltrini G. C.,
Tognella S.,
Conigliaro S.:
Bewertung der Spezifität der
antiproliferativen Pharmaka
N-Lost, Triäthylenmelamin und
Cyclophosphamid.
Haemat. lat. 4,
411 - 422 (1961)

- Schleiermacher E.: Über den Einfluß von Trenimon
und Endoxan auf die Meiose
der männl. Maus.
Humangenetik 3,
127 - 133 (1966)
- Chromosomenaberrationen bei
Mitosen und Meiosen in vivo.
Arch. Toxikol. 28,
105 - 114 (1971)
- Schleiermacher E., Mutationen durch chemische
Schroeder T. M., Einwirkung bei Säuger und
Mensch.
Adler I. D., Dtsch. Med. Wochr. 92,
Vrba M., 2 343 - 2 350 (1967)
Vogel F.:
- Schmid E., Comparison of the Chromosome
Bauchinger M.: Damage induced by Radiation
and Cytosan
Therapy in Lymphocytes of
Patients with Gynaecological
Tumors.
Mut. Res. 21,
271 - 274 (1973)
- Schmid W.: The Mikronukleustest
Mut. Res. 31,
9 - 15 (1975)
- Schmid W., Chemical Mutagenesis
Arakaki D. T., The chin. Hamster Bone Marrow
as an in Vivo Test System.
Breslau N. A., Humangenetik 11,
Culbertson J. C.: 103 - 118 (1971)
- Schmid W., The Mikronukleustest
v. Ledebur M.: Methodological Aspects.
Mut. Res. 19,
109 - 117 (1973)

- Schmid W.
Steiger G. R.:
Chromosome Studies on Bone Marrow from chin. Hamsters treated with Benzodiazepine Tranquillizers and Cyclophosphamid.
Mut. Res. 7,
99 - 108 (1969)
- Siebert D.:
A new Method for testing Genetically Active Metabolites. Urinary Assay with cyclophosphamid (Endoxan, Cytosan) and *Saccharomyces Cerevisiae*.
Mut. Res. 17,
307 - 314 (1973)
- Stegner I.:
Vergleichende Mutagenitätsuntersuchungen von drei Cyclophosphamiden am Knochenmark des chin. Hamsters. Staatsexamensarbeit an der Ruprecht-Karl Universität Heidelberg (1974)
- Tates A. D.,
Natarajan A. T.:
A correlative Study on the Genetic Damage induced by Chemical Mutagens in Bone Marrow and Spermatogonie of mice.
I. CNU-Ethanol
Mut. Res. 37,
267 - 278 (1976)
- Vogel F.,
Röhrborn G.:
Mutationen durch chemische Einwirkung bei Säuger und Mensch.
Dtsch. Med. Wschr. 92,
2 315 - 2 321 (1967)
- Testung von Fremdstoffen auf Mutagenität.
Arzneim. Forsch. 24, Nr. 10,
1 665 - 1 677 (1974)

- Weber E.: An Evaluation of the Mikro-
nukleus Test Using Triethylene-
melanin, Trimethylphosphate,
Hycanthone and Niridazole.
Mut. Res. 28,
101 - 106 (1975)
- Weiß A.,
Weiß B.: Karzinogenese durch Lost-
Exposition beim Menschen, ein
wichtiger Hinweis für die
Alkylantien Therapie.
Dtsch. Med. Wschr. 100,
919 - 923 (1975)
- Wurmbach W.: Lehrbuch der Zoologie I
Gustav Fischer Verlag
Stuttgart (1957)

Herrn Prof. Dr. G. Röhrborn,
Direktor des Institutes für
Humangenetik und Anthropologie
der Universität Düsseldorf,
danke ich für die Erlaubnis
und die großartige wissen-
schaftliche und technische
Unterstützung, diese Arbeit
in seinem Institut erstellen
zu können.

Herrn Dr. A. Basler,
Institut für Humangenetik und
Anthropologie der Universität
Düsseldorf, danke ich für die
wertvollen Ratschläge, die mir
bei der Fertigstellung der Ar-
beit eine große Hilfe waren.

•

Lebenslauf

17. Mai 1950	Geburt in Möchengladbach als 2. Sohn von Josef Victor und seiner Ehefrau Ida geb. Mümken
1956 - 1960	Besuch der Volksschule in Mönchengladbach
1960 - 1968	Gymnasialausbildung am Stift. Hum. Gymnasium in Mönchenglad- bach
1968	Reifeprüfung
1968 - 1972	Soldat auf Zeit bei der Bundes- wehr Teilstreitkraft Luftwaffe
1971	Beförderung zum Leutnant
1972	Entlassung aus der Bundeswehr
Oktober 1972	Aufnahme des Studium der Zahn- medizin an der Universität Düsseldorf
Oktober 1973	Naturwissenschaftliche Vorprüfung
Oktober 1975	Zahnärztliche Vorprüfung
Juni 1978	Zahnärztliche Prüfung

